



Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Bioquímica

Análisis funcional de Rim8, una proteína de la familia de
las arrestinas en *Saccharomyces cerevisiae*.

Tesis Doctoral

Antonio Herrador Fernández

Madrid, 2013.

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**Análisis funcional de Rim8, una proteína de la familia
de las arrestinas en *Saccharomyces cerevisiae*.**

Memoria que para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de
Madrid presenta el Licenciado en Bioquímica

Antonio Herrador Fernández

Director de la Tesis:

Dr. Olivier VINCENT

Científico titular del CSIC

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”
C.S.I.C.-UAM

Olivier VINCENT

Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols"

Arturo Duperier 4
28029 Madrid, España.
Tel: +34 5854495
Fax: +34915854401
Email: ovincent@iib.uam.es

El Dr. Olivier VINCENT, científico titular de C.S.I.C. en el Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" CSIC-UAM

CERTIFICA:

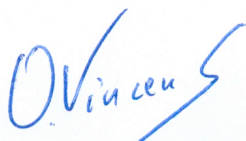
Que ANTONIO HERRADOR FERNÁNDEZ, licenciado en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo mi dirección y para la obtención de una Tesis Doctoral el trabajo de investigación titulado

"ANÁLISIS FUNCIONAL DE Rim8, UNA PROTEÍNA DE LA FAMILIA DE LAS ARRESTINAS EN *Saccharomyces cerevisiae*"

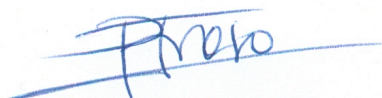
CONSIDERA:

Que tanto el trabajo experimental como las conclusiones del mismo reúnen las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Madrid, a 31 de Enero de 2013.



Fdo: Dr. Olivier VINCENT
Director de la Tesis Doctoral
Científico titular del C.S.I.C
Instituto de Investigaciones Biomédicas
"Alberto Sols"



Fdo: Dra. Pilar Eraso Mazmela
Tutora de la Tesis Doctoral
Profesora titular de la U.A.M.
Dpto Bioquímica
Facultad de Medicina de la UAM

A Blanca, a mis padres.
A mis padres, a Blanca.

Sobre la cubierta.

"La arrestina, el receptor, el agonista y sus amigos" (colorines carioca sobre folio de cuaderno). La pieza representa los mecanismos de señalización celular que son objeto de esta tesis. La artista Marina Novo Herrador se inspiró en los resultados obtenidos para crear la composición.

"Aquí alzó otra vez la voz maese Pedro y dijo:

*—Llaneza, muchacho, no te encumbres, que toda
afectación es mala."*

Don Quijote de la Mancha; Miguel de Cervantes.

Agradecimientos

Al Dr. Olivier VINCENT, porque esta tesis es tan suya como mía.

A la Dra. Pilar Eraso por la amabilidad con que ha aceptado ser la tutora de este trabajo.

A Rosine, Sebastien y Michel, por lo divertido que fue compartir con ellos la ubi *in vitro*.

A M^a Ángeles Navas y Carmen García-Herrero por defenderme de la peligrosa French Press.

A José Miguel y Josune por las colocalizaciones en Photoshop.

A Carlitos por su habilidad con el canutillo.

Resumen

En las células de mamíferos, las β -arrestinas desempeñan la función clave de regular la endocitosis de los receptores de siete hélices transmembrana (7TM). Recientemente, la proteína PalF del hongo *Aspergillus nidulans* fue identificada como el primer miembro de la familia de las arrestinas fuera de los metazoos. PalF y Rim8, su homólogo en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, son componentes clave de la ruta de señalización de pH ambiental. En esta ruta denominada *RIM* en levadura, las proteínas 7TM, Rim21 y Dfg16, actúan corriente arriba de Rim8 y de la maquinaria endocítica ESCRT (del inglés “Endosomal Sorting Complex Required for Transport”). Ya que las β -arrestinas interactúan con proteínas 7TM mediante sus dominios arrestina y con proteínas de la maquinaria endocítica mediante su región C-terminal, nos preguntamos si Rim8 podría llevar a cabo esta misma función en el contexto de la ruta *RIM*.

En este trabajo demostramos que la región N-terminal de Rim8 interactúa de forma directa con la región C-terminal de la proteína 7TM Rim21. Asimismo, Rim8 interactúa de forma directa, mediante su región C-terminal, con la subunidad Vps23 del complejo ESCRT-I. De igual modo, demostramos que en extractos proteicos Rim8 está asociado a varias subunidades del complejo ESCRT-I y que esta asociación es fundamental para la transmisión de la señal de pH.

Además, hemos caracterizado los determinantes moleculares que conjuntamente están involucrados en esta interacción: un motivo SXP y un residuo de lisina monoubicuitilado, ambos situados en el extremo C-terminal de Rim8 y altamente conservados.

Por otro lado, demostramos que Rim8 es reconocido por la ubiquitina ligasa Rsp5 a través de un motivo PXY próximo al residuo ubiquitilado de Rim8. Esta ubiquitina ligasa monoubicuitila Rim8 porque la unión del dominio UEV (del inglés “ubiquitin E2 variant”) de Vps23 al motivo SXP y a la ubiquitina conjugada impide que se extienda la cadena de ubiquitina. Proponemos un modelo en el cual la competición entre Rsp5 y Vps23 por la unión a la primera molécula de ubiquitina conjugada con Rim8 es responsable de este fenómeno.

Por último, demostramos que Rim8 se localiza en focos situados en la membrana plasmática de manera dependiente de la activación de la ruta *RIM* y que colocaliza con este mismo patrón con Rim21 y Vps23 cuando se co-sobreexpresa junto con estas proteínas.

Summary

Mammalian β -arrestins play a key role in the regulation of seven-transmembrane-spanning receptors (7TM) endocytosis. Recently, the fungal protein PalF from *Aspergillus nidulans* has been identified as the first non-metazoan member of the arrestin family. PalF and its homolog in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Rim8, are key components of the ambient pH signalling pathway. In the yeast *RIM* pathway, 7TM proteins Rim21 and Dfg16, act upstream of both Rim8 and the ESCRT ("Endosomal Sorting Complex Required for Transport") endocytic machinery. Because β -arrestins act as scaffold proteins which bind to both 7TM receptors and endocytic proteins through their arrestin domains and C-terminal region respectively, we wondered if Rim8 could mediate the connection between Rim21 and the ESCRT machinery in the *RIM* pathway.

Here we show that the Rim8 N-terminal region interacts with the C-terminal tail of Rim21 and that Rim8 C-terminus binds directly to the ESCRT-I subunit Vps23. Furthermore, we show that Rim8 associates with ESCRT-I subunits in cellular extracts and that this interaction is essential for pH signal transduction.

Moreover, we have identified the molecular determinants involved in Rim8 interaction with Vps23: an SXP motif and a ubiquitylated lysine residue, K521, both highly conserved and located within Rim8 C-terminus.

We demonstrate, as well, that the E3 ubiquitin ligase Rsp5 recognizes a PXY motif located near the ubiquitylated residue in Rim8. Rsp5 monoubiquitylates Rim8 because the Vps23 UEV (ubiquitin E2 variant) domain binds to both the SXP motif and the first conjugated ubiquitin, thus blocking ubiquitin chain elongation. We propose a model in which the competition of Vps23 with Rsp5 for binding to the first conjugated ubiquitin is responsible for this mechanism.

Finally, we show that Rim8 localizes to plasma membrane foci in an ambient pH-dependent manner and that it colocalizes with Rim21 and Vps23 when overexpressed together with these proteins.

ÍNDICE

Índice

ÍNDICE	1
ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN	5
EL DESCUBRIMIENTO DE LAS ARRESTINAS Y SU PRIMERA CLASIFICACIÓN.	5
LA ESTRUCTURA DE LAS ARRESTINAS.	5
LA FUNCIÓN CLÁSICA DE LAS ARRESTINAS: DESENSITIZACIÓN.	5
LAS ARRESTINAS COMO ACTIVADORAS DE RUTAS INDEPENDIENTES DE PROTEÍNAS G.	7
ARRESTINAS Y ENDOCITOSIS.	7
LAS ARRESTINAS COMO PROTEÍNAS QUE ADAPTAN EL RECEPTOR A LA MAQUINARIA ENDOCÍTICA.	7
TIPOS DE RECEPTOR Y PATRONES DE INTERNALIZACIÓN.	8
LAS ARRESTINAS COMO ADAPTADORAS PARA UBICUITINA LIGASAS.	11
LA β -ARRESTINA-2 COMO ADAPTADOR PARA LA UBICUITILACIÓN DEL RECEPTOR β 2 ADRENÉRGICO.	11
LA β -ARRESTINA, EL RECEPTOR CXCR4 Y LA UBICUITINA: UN CASO PARTICULAR.	11
LAS NUEVAS ARRESTINAS, QUE EN REALIDAD SON LAS MÁS ANTIGUAS.	12
LAS PRIMERAS “NUEVAS ARRESTINAS”.	12
LA NUEVA CLASIFICACIÓN DE LAS ARRESTINAS.	12
LAS α -ARRESTINAS.	13
LA RUTA <i>PAL/RIM</i> .	15
LA RUTA <i>PAL</i> EN <i>ASPERGILLUS NIDULANS</i> .	16
LA RUTA <i>RIM</i> EN <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .	17
ASPECTOS GENERALES DE LA ENDOCITOSIS EN LEVADURA.	18
CONSECUENCIAS DEL DESCUBRIMIENTO DE LA IMPLICACIÓN DE ESCRT EN LA RUTA RIM.	19
LA MAQUINARIA ESCRT.	20
LOS COMPLEJOS ESCRT.	20
FORMACIÓN DE LAS VESÍCULAS.	23
¿CÓMO SE SELECCIONAN Y RECLUTAN LAS PROTEÍNAS QUE SEGUIRÁN LA VÍA ESCRT?	23
MECANISMOS PARA GENERAR UNA PROTEÍNA MONOUBICUITILADA.	24
ENZIMAS TIPO HECT: MONOUBICUITILACIÓN ACOPLADA.	24
ENZIMAS TIPO RING: MONOUBICUITILACIÓN POR INHIBICIÓN DE LA UNIÓN A UBICUITINA.	24
OBJETIVOS	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.	26
MEDIOS DE CULTIVO PARA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .	26
MEDIOS PARA <i>ESCHERICHIA COLI</i> .	27
CEPAS DE MICROORGANISMOS UTILIZADAS.	27
CEPAS DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .	27
CEPAS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> .	29
VECTORES	29
PLÁSMIDOS PARA LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN BACTERIA.	29
PLÁSMIDOS UTILIZADOS PARA LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS <i>IN VITRO</i> .	31
PLÁSMIDOS PARA LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .	31
OLIGONUCLEÓTIDOS	33
TÉCNICAS DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>.	35
TRANSFORMACIÓN DE <i>S. CEREVISIAE</i> .	35
EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO DE <i>S. CEREVISIAE</i> .	35
EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES DE <i>S. CEREVISIAE</i> .	36

TÉCNICAS GENERALES DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.	36
INMUNOPRECIPITACIÓN CON RESINA ACOPLADA A ANTICUERPO A-HA O A-FLAG.	36
ENSAYOS DE INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS.	37
PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EXPRESADAS EN BACTERIAS.	37
ENSAYOS DE UNIÓN <i>IN VITRO</i> .	38
MARCAJE DE SUSTRATOS PARA UBICUITILACIÓN <i>IN VITRO</i> POR FOSFORILACIÓN CON [γ - 32 P]ATP.	39
ENSAYOS DE UBICUITILACIÓN <i>IN VITRO</i> .	39
ENSAYOS PARA MEDIR LA ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA.	40
“KITS” DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA.	40
MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	41
RESULTADOS	42
BLOQUE 1: RECLUTAMIENTO DE LA MAQUINARIA ESCRT MEDIADO POR RIM8.	42
UN MOTIVO SXP CONSERVADO Y SITUADO EN EL EXTREMO C-TERMINAL DE RIM8 MEDIA EN SU INTERACCIÓN CON LA SUBUNIDAD Vps23 DE ESCRT-I.	42
RIM8 SE MONOUBICUITILA EN UN RESIDUO DE LISINA SITUADO EN SU EXTREMO C-TERMINAL.	45
LA UBICUITILACIÓN DE RIM8 DEPENDE DE LA E3 UBICUITINA LIGASA Rsp5, QUE SE UNE A UN MOTIVO PXY EN RIM8.	48
EL MOTIVO SXP Y EL RESIDUO MONOUBICUITILADO DE RIM8 CONTRIBUYEN A SU UNIÓN <i>IN VIVO</i> CON Vps23.	49
RIM8 ESTÁ ASOCIADO CON LAS SUBUNIDADES Vps23 Y Vps28 DE ESCRT-I DE MANERA INDEPENDIENTE DEL PH AMBIENTAL.	53
BLOQUE 2: MECANISMOS DE MONOUBICUITILACIÓN DE RIM8.	55
LA UBICUITILACIÓN DE RIM8 ES INDEPENDIENTE DE LA ACTIVACIÓN DE LA RUTA RIM, PERO DEPENDIENTE DE LA INTERACCIÓN DEL DOMINIO UEV DE Vps23 CON EL MOTIVO SXP Y LA UBICUITINA.	55
EL DOMINIO UEV DE Vps23 INCREMENTA LA MONOUBICUITILACIÓN DE RIM8 PORQUE IMPIDE QUE SE POLIUBICUITILE.	57
LA INTERACCIÓN DEL DOMINIO UEV DE Vps23 TANTO CON UBICUITINA COMO CON EL MOTIVO SXP DE RIM8 ES NECESARIA PARA LA INHIBICIÓN DE LA POLIUBICUITILACIÓN DEL RESIDUO K521 DE RIM8.	61
<i>IN VIVO</i> , Vps23 IMPIDE QUE RIM8 SE POLIUBICUITILE PORQUE BLOQUEA LA FORMACIÓN DE CADENAS DE UBICUITINA ENLAZADAS EN K63.	64
BLOQUE 3: LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE RIM8.	66
COLOCALIZACIÓN EN LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE RIM8 Y Vps23 SOBREEXPRESADOS.	66
LA LOCALIZACIÓN DE RIM8 DEPENDE DEL PH Y COINCIDE CON LA DE RIM21.	67
DISCUSIÓN	69
RIM8, UN ADAPTADOR ALTERNATIVO A Vps27 PARA EL RECLUTAMIENTO DE ESCRT.	69
RIM8: SIMILITUDES Y DIFERENCIAS FUNCIONALES CON OTRAS ARRESTINAS.	70
¿DÓNDE LLEVA A CABO RIM8 SU FUNCIÓN?	72
DETERMINANTES MOLECULARES DE LA INTERACCIÓN DE RIM8 CON Vps23.	75
EL MOTIVO SXP.	75
MONOUBICUITILACIÓN DE RIM8.	76
FUNCIÓN DE UN DOMINIO DE UNIÓN A UBICUITINA EN LA MONOUBICUITILACIÓN DE RIM8.	77
PARALELISMOS ENTRE LA RUTA <i>RIM</i> Y LA GEMACIÓN DE LOS RETROVIRUS.	81
CONCLUSIONES	83
BIBLIOGRAFÍA.	84
ANEXO.	96

ABREVIATURAS

Abreviaturas

7TM	7 hélices transmembrana
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMP _c	Adenosín monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARRDC	“Arrestin Domain Containing”
ART	“Arrestin Related Trafficking adaptor”
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	“Bovin Serum Albumin”
D.O.	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
ESCRT	“Endosomal Sorting Complex Required for Transport”
FoA	“5-Fluorootic Acid”
FYVE	“Fab 1, YOTB, Vac 1 and EEA1 homologous”
GAD	“Gal4 Activation Domain”
GAT	“GGA and TOM1 homologous”
GDP	Guanosín 5'-difosfato
GFP	“Green Fluorescent Protein”
GLUE	“GRAM-Like Ubiquitin-binding in EAP45”
GRK	“G protein-coupled Receptor Kinase”
GST	Glutación S-transferasa
GTP	Guanosin 5'-trifosfato
HECT	“Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus”

Abreviaturas

ILV	“Intraluminal Vesicles”
LB	Medio para bacterias “Lysogeny Broth”
MIM	“MIT Interacting Motif”
MIT	“Microtubule Interacting and Transport”
MVB	“Multivesicular Body”
NRE	“Negative Regulatory Element”
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
PFAM	“Protein Family database”
PI3P	Fosfatidil Inositol 3 fosfato
PI4P	Fosfatidil Inositol 4 fosfato
PKA	Proteína Kinasa A dependiente de AMP cíclico
PVE	“Prevacuolar Endosome”
RIM	“Regulator of IME2”
RING	“Really Interesting New Gene”
SD	Medio mínimo para levadura “Synthetic Dextrose”
SDS	“Sodium dodecyl sulfate”
SNARE	“Soluble NSF (N-Ethylmaleimide- Sensitive Factor) Attachment Protein Receptor”
UIM	“Ubiquitin interacting motif”
UBD	“Ubiquitin Binding Domain”
UEV	“Ubiquitin E2 variant”
VHS	“VPS27, Hrs, and STAM homologous”
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VPS	“Vacuolar Protein Sorting”
YNB	“Yeast Nitrogen Base”
YPAD	Medio completo de levadura “Yeast Peptone Adenine Dextrose”

INTRODUCCIÓN

Introducción

El descubrimiento de las arrestinas y su primera clasificación.

La primera proteína que más tarde recibió el nombre “arrestina” fue descubierta en dos estudios independientes y denominada “antígeno-S” y “proteína de 48kDa”, respectivamente [196, 95]. Poco después, se demostró que ambas son la misma proteína [141]. El nombre “arrestina” surgió cuando se demostró que su unión a la proteína fotorreceptora rodopsina, cuya activación y fosforilación se había inducido estimulándola con luz, inhibía, “arrestaba”, la consecuente activación de la fosfodiesterasa [198]. Más adelante, una arrestina “no visual” fue identificada y clonada basándose en su capacidad de interrumpir la señalización mediada por el receptor β_2 adrenérgico. Se la llamó β -arrestina [21, 108].

La familia de las arrestinas se incrementó luego con el descubrimiento de una isoforma de la β -arrestina, β -arrestina-2, y con la identificación de otra arrestina visual: la arrestina del cono [6, 39]. La nomenclatura actual refleja la cronología de sus descubrimientos: se denomina arrestina-1 y arrestina-4 a las arrestinas visuales y arrestina-2 y arrestina-3 (o β -arrestina-1 y 2) a las β -arrestinas. Esta clasificación permaneció cerrada hasta muchos años después, cuando, en hongos, se descubrió una proteína relacionada con las arrestinas [71]. Este hallazgo abrió la puerta a la identificación de un grupo de proteínas que, aunque compartía similitudes funcionales y estructurales con las arrestinas ya descritas, también presentaba características que las diferenciaban. Se las llamó α -arrestinas, diferenciándolas de las β -arrestinas y por coherencia con su aparición evolutiva anterior [2]. Aunque su descripción solo se abordará en el final de esta parte de la introducción, el estudio de uno de sus miembros será el objeto principal de este trabajo.

La estructura de las arrestinas.

Tanto las arrestinas visuales como las β -arrestinas tienen una estructura similar: dos dominios “arrestina” en forma de copa unidos por una región bisagra, y una cola C-terminal. La estructura terciaria de cada dominio arrestina es de siete láminas beta antiparalelas en forma de “sándwich”. Ambos dominios son unidades funcionales independientes.

La unión regulada a receptores de siete hélices transmembrana (7TM), como la rodopsina o el receptor β_2 adrenérgico, es posible gracias a su estricta selectividad por los receptores activos y fosforilados. La estructura basal de la arrestina inactiva se mantiene por interacciones intramoleculares. Una es el llamado “núcleo polar”; una red de cinco aminoácidos cargados en la concavidad de los dominios arrestina que los mantiene unidos entre sí. Inmerso en este núcleo se encuentra el “sensor de fosfato” que, mediante su interacción con la cola C-terminal, mantiene el estado inactivo de la proteína. Al reconocerse con baja afinidad el receptor fosforilado, esta interacción se perturba. La arrestina sufre cambios conformacionales y libera sitios adicionales que posibilitan su unión con alta afinidad al receptor [61].

La función clásica de las arrestinas: desensitización.

Los receptores 7TM constituyen una amplia familia de proteínas cuyo número en el genoma humano se ha estimado en más de 600 [142]. Su estructura, con un dominio extracelular, una parte transmembranosa (siete

Introducción

hélices transmembrana, característica que les da nombre) y una cola citoplásmica es clave en su funcionamiento; reconocen una gran variedad de estímulos en el exterior (hormonas, neurotransmisores, iones, etc.) y generan cascadas de señalización que provocan respuestas intracelulares. Esta señalización se inicia, tras la unión del agonista, con un cambio conformacional en la región intracelular que permite la unión de proteínas G heterotriméricas (Figura I-1A). Cuando la proteína G se une al receptor, la subunidad $G\alpha$ intercambia GDP por GTP y se disocia del dímero $G\beta\gamma$. Estas subunidades activas unidas al receptor transducen y amplifican la señal modulando la actividad de diversos efectores como adenilato ciclasas, fosfolipasas o canales iónicos [124]. Se estima que al menos el 30% de las drogas que se usan en clínica son agonistas o antagonistas de esta familia de receptores [199].

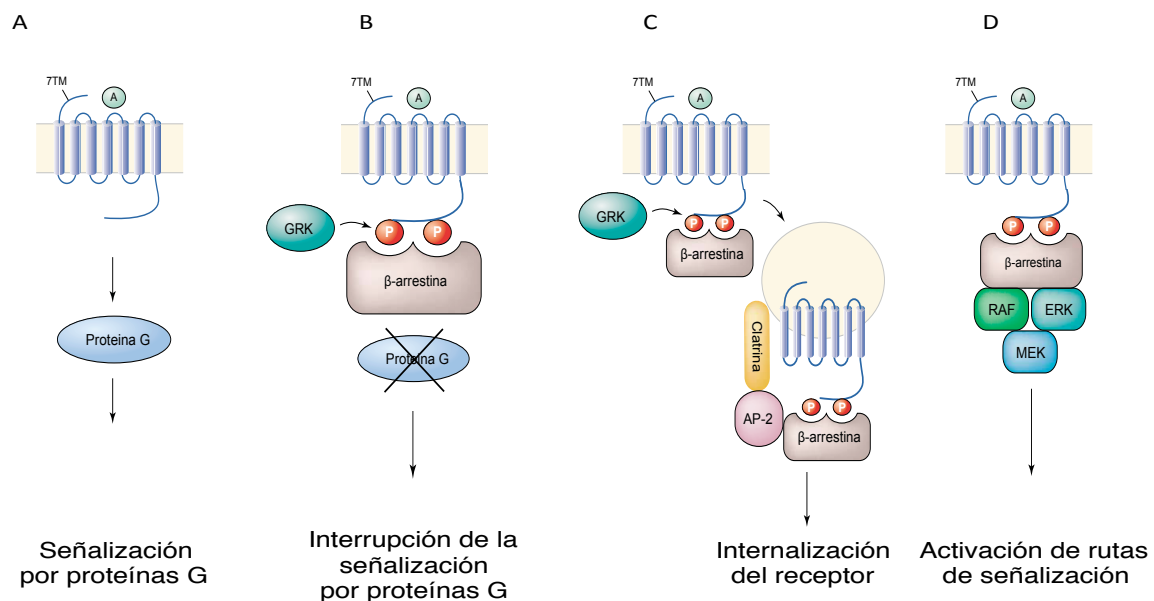


Figura I-1: **Funciones de las β -arrestinas.** Tomado y modificado de Lefkowitz y Whalen [103]. (A) Activación del receptor 7TM y señalización por proteínas G. (B) Fosforilación por GRK y desensitización del receptor por unión a la β -arrestina. (C) Endocitosis del receptor dependiente de clatrina y AP-2 mediada por β -arrestina. (D) Activación de rutas independientes de proteínas G.

Un aspecto importante en este mecanismo es el de su interrupción en presencia constante de agonista. Las responsables de llevarlo a cabo son las proteínas quinasas de receptor acoplado a proteínas G (GRK) y las arrestinas, que funcionan de manera secuencial en la llamada “desensitización homóloga”. Una vez el receptor ha sido activado, es fosforilado en su región citosólica por las GRK, lo que provoca el reclutamiento de las arrestinas, que desplazan a la proteína G por impedimento estérico silenciando así la señal (Figura I-1B). De hecho, se ha observado que las β -arrestinas son proteínas citosólicas que se relocalizan a la membrana plasmática cuando el receptor se activa [207, 41].

Además, las β -arrestinas pueden actuar como proteínas andamio y reclutar enzimas (fosfodiesterasas, diacilglicerol kinasas) que degradan los segundos mensajeros generados por las proteínas G, lo que proporciona un mecanismo de silenciamiento adicional [140, 123].

Las arrestinas como activadoras de rutas independientes de proteínas G.

Además de sus funciones clásicas, se ha comprobado que las β -arrestinas son capaces de iniciar cascadas específicas. En esta función, las β -arrestinas actúan como andamios dependientes de receptor y coordinan la interacción de moléculas señalizadoras [111]. Un ejemplo es la unión de la β -arrestina a cRAF-1 (MAPK kinasa kinasa) y ERK2 (MAPK) que junto con el reclutamiento de MEK1 (MAPK kinasa) forman el complejo de activación de ERK2 [40] (Figura I-1D). En los últimos años, además, se ha hecho evidente que algunos ligandos son capaces de activar las rutas dependientes de β -arrestina sin inducir la activación de proteínas G. A este fenómeno se le ha llamado “agonismo sesgado”. Estos hallazgos han abierto un importante campo de estudio, ya que la señalización específica vía arrestinas podría ser explotada para el desarrollo de nuevas drogas que limiten sus efectos a rutas concretas [197].

Arrestinas y endocitosis.

En general, los receptores 7TM son internalizados por endocitosis tras la desensitización. Globalmente, la endocitosis se concibe como un proceso en el que las células internalizan fracciones de su membrana lipídica con las proteínas que en ellas se encuentran embebidas. Estas porciones de membrana generan vesículas internas que finalmente se separan de la membrana plasmática. Tras la endocitosis, las proteínas pueden seguir distintos destinos; bien pueden ser recicladas a la membrana plasmática o seguir una vía degradativa. La degradación se consigue mediante la inclusión de estas proteínas en el lumen del lisosoma (metazoos) o la vacuola (hongos). Independientemente del camino que sigan, las proteínas circulan por una serie de compartimentos membranosos de forma estrictamente regulada, lo que garantiza su llegada al destino oportuno.

Se puede pensar en la endocitosis de los receptores 7TM como en un mecanismo complementario a la desensitización. La extracción de la membrana plasmática sería una forma por la que silenciar la señal. Sin embargo, esta visión no es completa ya que el secuestro del receptor por endocitosis tiene también una función en su defosforilación y resensitización, así como en su degradación y en la activación de rutas alternativas [64].

Las arrestinas como proteínas que adaptan el receptor a la maquinaria endocítica.

Interacción con clatrina.

La internalización de los receptores 7TM (también llamada “secuestro”) se puede llevar a cabo por distintos mecanismos, incluyendo vesículas recubiertas de clatrina, caveolas y vesículas no recubiertas. Además, en muchos casos, este fenómeno requiere adaptadores que enlazan la maquinaria endocítica con el receptor o “carga”. De ello se encargan las β -arrestinas aunque existen adaptadores alternativos [119, 46] (Figura I-1C). La idea de que las β -arrestinas podían estar implicadas en el secuestro surgió de la observación de que, en células que expresan versiones mutantes de las β -arrestinas, la internalización del receptor β_2 adrenérgico está bloqueada. Además, sobreexpresando la β -arrestina, es posible recuperar la internalización de receptores mutantes. Este efecto se potencia cuando se sobreexpresa la GRK que fosforila al receptor [47]. El siguiente salto en el entendimiento de los mecanismos que controlan este fenómeno surgió del descubrimiento de la interacción estequiométrica y de alta afinidad entre la β -arrestina y la cadena pesada de la clatrina [59]. También, se demostró que la β -arrestina y el receptor colocan con clatrina únicamente en presencia de

agonista. A estos estudios iniciales siguió una multitud de publicaciones en las que se caracterizaron y mapearon los determinantes específicos de la interacción, así como la implicación de cada uno en la internalización [58, 94] (para revisión, ver [197]). La región de unión en la clatrina se localiza en los residuos 89-100 de su dominio C-terminal y en las β -arrestinas existe un motivo de unión a clatrina cercano al extremo C-terminal.

La interacción de las dos β -arrestinas con clatrina está regulada por su fosforilación. Las β -arrestinas son fosfoproteínas citosólicas que se defosforilan rápidamente al ser reclutadas por el receptor β 2 adrenérgico. En este caso, la kinasa responsable es la caseína kinasa-2 [89]. Usando arrestinas mutantes; fosfomiméticas (residuos de serina y treonina por aspartato) o defectivas en fosforilación (residuos de serina y treonina por alanina), se ha demostrado que la defosforilación es importante para la interacción con clatrina y posterior internalización del receptor. Esta defosforilación es transitoria [107].

Interacción con otras proteínas de la maquinaria endocítica.

En los últimos años se ha ampliado el número conocido de interactores endocíticos de las arrestinas. Un motivo peptídico en la región C-terminal de las β -arrestinas media su interacción con la proteína adaptadora de clatrina AP2 [99]. Esta interacción, que tiene lugar cuando el receptor activo recluta la arrestina, facilita la translocación del complejo receptor-arrestina a vesículas recubiertas de clatrina [99, 43]. Otros casos descritos de proteínas que regulan la endocitosis interaccionando con las arrestinas incluyen: NSF, ARF6 y la fosfatidilinositol-4-fosfato (PI4P) kinasa (revisado en [104]). Además, analizando por espectrometría de masas los inmunoprecipitados de la β -arrestina, se ha sugerido que existe toda una compleja red de proteínas interactoras que regula la endocitosis [202].

Tipos de receptor y patrones de internalización.

Como se comentó anteriormente, las arrestinas son proteínas citosólicas que se relocalizan rápidamente en la membrana plasmática cuando el receptor es activado [207, 41]. La interacción de la arrestina con el receptor forma un complejo cuya estabilidad determinará las características del itinerario que seguirán. En parte, esta estabilidad está regida por determinantes moleculares en la cola citoplásmica del receptor; en concreto la de un motivo rico en residuos de serina y treonina en su región C-terminal [130]. De este modo se han podido clasificar los receptores en dos subtipos. Los receptores que contienen los motivos fosforilables forman complejos estables con las arrestinas que son internalizados conjuntamente en vesículas endocíticas. Además, cuando se localizan en los endosomas, forman plataformas señalizadoras que inducen una actividad MAPK sostenida. A estos receptores se los denomina de “clase B”. Por el contrario, los receptores cuya cola citoplásmica presenta patrones de fosforilación distintos, reclutan las arrestinas de manera transitoria y forman complejos señalizadores efímeros en la membrana plasmática. Esta clase de receptores se resensitiza y recicla a la membrana plasmática más rápidamente. Son los receptores de “clase A” [130, 190].

Con el descubrimiento de que las isoformas de las GRKs fosforilan sitios distintos en el receptor, se ha propuesto un modelo en el que las combinaciones de residuos que reciben o no un fosfato, generan un patrón de fosforilación reconocido de manera específica por la arrestina. Dependiendo de la información codificada en ese “código de barras de fosforilación”, las β -arrestinas desencadenan respuestas específicas [153]. Este

mecanismo, que solapa con el comentado anteriormente del “agonismo sesgado”, está actualmente siendo objeto de un intenso estudio, debido a su prometedora implicación en el desarrollo de drogas de gran especificidad.

La ubiquitilación de las β -arrestinas determina el patrón de tráfico del receptor.

Las arrestinas, además de ser fosforiladas, sufren otros tipos de modificaciones postraduccionales. Uno de ellos es la ubiquitilación, que es inducida por el agonista y tiene un papel clave en la internalización [171].

La ubiquitilación es un proceso altamente regulado en el que el residuo de glicina C-terminal de la ubiquitina (una pequeña proteína de 76 aminoácidos presente en todas las células eucariotas) se enlaza covalentemente con el grupo amino ϵ de un residuo de lisina en una proteína sustrato. Esta reacción requiere la función coordinada de tres enzimas. En un primer paso, dependiente de ATP, la ubiquitina es activada por la enzima E1 (activadora), luego transferida a la enzima E2 (portadora) y finalmente añadida al sustrato por (o con la ayuda de, dependiendo de los casos) la enzima E3 (ligasa) [72]. Las E3 pueden clasificarse en aquellas con dominio HECT y aquellas con dominio RING. Las HECT actúan como enzimas que aceptan la ubiquitina conjugada con la E2, reconocen el sustrato y transfieren la molécula. Sin embargo, el papel de las RING es estructural; reconocen el sustrato y funcionan como un andamio entre este y la E2 que transfiere directamente la ubiquitina al sustrato.

Si solo se añade una ubiquitina al sustrato, este queda monoubicuitilado. Si se añade una ubiquitina a distintos residuos de lisina, el sustrato queda multiubiquitilado (Figura I-2). Sucede, además, que la ubiquitina contiene siete residuos de lisina, cada uno de los cuales puede ser, a su vez, sustrato de sucesivas rondas de ubiquitilación. Si esto sucede y sobre el sustrato se forman cadenas de ubiquitina en forma de ramas, hablamos de poliubiquitilación (Figura I-2).

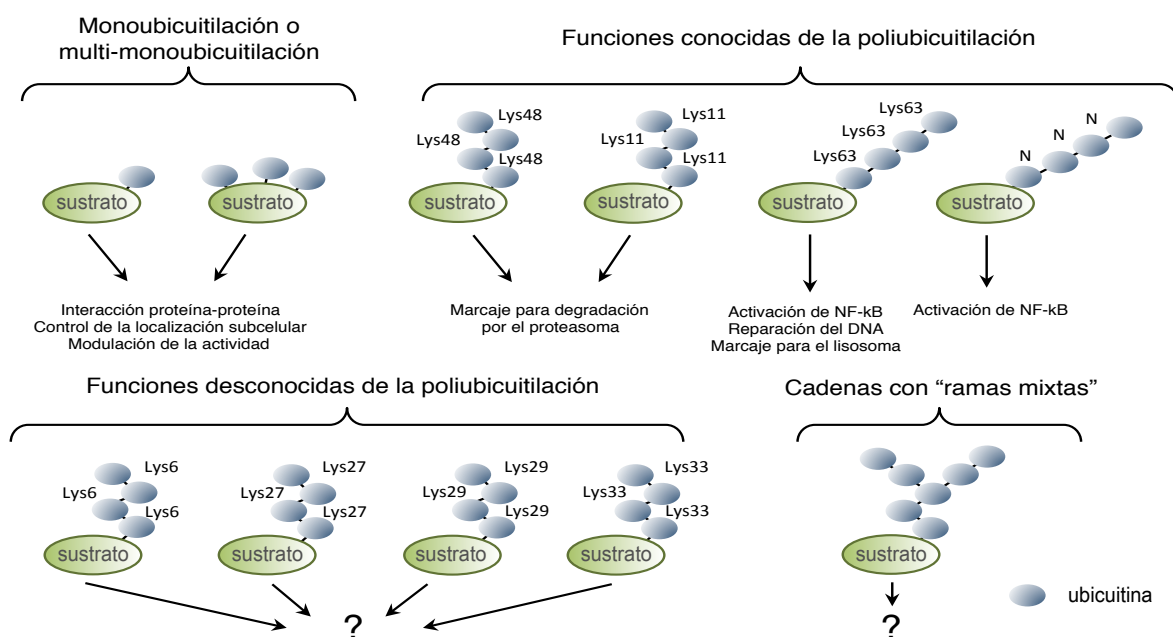


Figura I-2: **Diferentes posibilidades de modificación de una proteína por ubiquitina.** Tomado y modificado de Ye *et al.* [205]. En la mayoría de ocasiones, la primera ubiquitina se añade al grupo amino- ϵ de residuos de lisina en la proteína sustrato. Además, la ubiquitina contiene siete residuos de lisina, que pueden ser sustrato para sucesivas rondas de ubiquitilación. Es posible también la adición de ubiquitinas al extremo N-terminal de proteínas o de la propia ubiquitina. La naturaleza de los enlaces formados determinará las consecuencias fisiológicas de la modificación.

Dependiendo de qué residuo de lisina sea aceptor de la nueva ubiquitina, se forman distintos tipos de cadena. Las más comunes son las formadas sobre el residuo K48 (este enlace hace que la cadena adopte una conformación más cerrada [194]) y las formadas sobre el residuo K63 (de conformación más alargada [193]). La longitud y el tipo de cadena están gobernadas, sobre todo, por la función de las enzimas E2 y E3. Estas variables configuran un código de ubiquitilación que define su papel fisiológico.

La primera función que se definió para la ubiquitina fue la de dirigir las proteínas sustrato, modificadas con cadenas tipo K48, hacia un gran complejo de múltiples subunidades, el proteasoma 26S, donde son degradadas. La ubiquitina no se degrada, ya que es previamente reciclada del sustrato por enzimas deubiquitiladoras [156, 65, 79]. Posteriormente, estudios iniciados en *Saccharomyces cerevisiae* demostraron que la ubiquitilación desencadena la internalización y transporte al endosoma de un gran número de proteínas de membrana [101], lo que reveló una nueva función de esta pequeña proteína, en este caso, independiente del proteasoma. La señal preferencial en este proceso es la monoubiquitilación o la formación de cadenas tipo K63.

Más adelante, en un artículo clave, se demostró que la β -arrestina-2 se ubiquitila en respuesta al agonista. Esta modificación es necesaria para la internalización del receptor. La responsable de ello es una oncoproteína que regula negativamente a p53 y que interacciona con la β -arrestina: la ubiquitina ligasa Mdm2 [171]. El papel de la ubiquitilación de la arrestina en endocitosis no ha sido entendido en su completitud. Una hipótesis sugiere que ya que la arrestina es capaz de interactuar con proteínas endocíticas, la ubiquitilación podría tener un papel crucial en su reconocimiento. De hecho, una forma mutante de la β -arrestina-2 que no se puede ubiquitilar (ya que todos sus residuos de lisina han sido mutados: " β -arrestina-2[KO]") exhibe mermada su capacidad de interacción con clatrina [172]. Aunque no se ha descrito hasta la actualidad ninguna interacción entre la clatrina y la ubiquitina, se ha sugerido que la ubiquitilación de la arrestina pudiera estabilizar la unión a clatrina a través de otras proteínas endocíticas que, además de unir clatrina, tienen dominios de unión a ubiquitina. Eps15 y epsinas son candidatos para ello [20].

Como se mencionó anteriormente, según la estabilidad de su asociación con la arrestina y su patrón de tráfico, los receptores 7TM se han dividido en clase A y B [41]. Este hecho está gobernado también por la ubiquitilación de la arrestina. Los receptores de clase B inducen una ubiquitilación más duradera de esta proteína, lo que provoca que los complejos sean más estables y se observen incluso tras la internalización del receptor. Esto es coherente con su localización en el endosoma, donde provocan una activación sostenida de MAPK [172, 167]. Sin embargo, los receptores de clase A, que se disocian rápidamente, solo inducen una ubiquitilación transitoria de la arrestina. Para que ello suceda, es necesaria la interacción entre la arrestina y la deubiquitilasa USP33 [168].

En un nivel de complejidad superior, la ubiquitilación puede ser inducida en distintos residuos de la arrestina dependiendo del tipo de receptor y su estado de activación/fosforilación. Estas modificaciones provocan cambios conformacionales que dotan a la arrestina de una gran versatilidad para interactuar de manera específica con las moléculas apropiadas en distintos compartimentos [166]. Con todos estos datos, parece claro que el papel de

la ubiquitilación de la arrestina es el de reforzar la interacción con el receptor y, de algún modo, mediar en su internalización y mejorar su capacidad de reclutar otras proteínas señalizadoras [167].

Las arrestinas como adaptadoras para ubiquitina ligasas.

Además de ser ellas mismas sustrato de ubiquitilación, las arrestinas funcionan como adaptadores que reclutan ubiquitina ligasas a los receptores. De manera general, la ubiquitilación del receptor en lugar de determinar su internalización (esta función depende de la ubiquitilación de la arrestina) parece controlar los estadios posteriores del tráfico, en los que se decide si será degradado o reciclado a la membrana plasmática.

La gran cantidad de receptores de membrana y de ubiquitina ligasas (más de 500 en el genoma humano) ha generado complejos mecanismos de regulación. En algunos casos, los receptores tienen motivos de reconocimiento para las ligasas (por ejemplo los motivos denominados "PY" (PPXY/PXY), otras veces, son residuos fosforilados los que se reconocen. En otras ocasiones, los receptores necesitan proteínas adaptadoras. Dos ejemplos ilustrativos se describen a continuación.

La β -arrestina-2 como adaptador para la ubiquitilación del receptor β 2 adrenérgico.

En el estudio en el que se publicó la ubiquitilación de la β -arrestina-2, se observó que al receptor β 2 adrenérgico le sucede lo mismo. Además, se vio que si no se ubiquitila, se evita su degradación, pero no su internalización [171]. Sorprendentemente, la enzima que ubiquitila la arrestina (Mdm2) no es la responsable de modificar el receptor. En un estudio posterior, se descubrió que la responsable es una ubiquitina ligasa que interacciona con la β -arrestina-2, modifica el receptor y determina su degradación. Esta enzima es una de las E3 tipo HECT: Nedd4 [170].

Una vez internalizado el receptor, su destino último todavía no ha sido dictado. La deubiquitilación por una deubiquitilasa puede evitar su degradación. De hecho, se ha comprobado que dos enzimas deubiquitiladoras regulan el tráfico del receptor promoviendo su reciclamiento a la membrana plasmática y su resensitización. Estas enzimas son USP33 y USP20 [168, 22]. Aunque primeramente USP33 se había identificado como un interactor de la β -arrestina-2, más adelante se comprobó que interacciona con el receptor antes de la estimulación con el agonista. De hecho, parece que es el receptor el que favorece la translocación de la enzima a la arrestina, induciendo su deubiquitilación y separación del receptor una vez internalizado. En etapas posteriores, la asociación directa de USP33 con el receptor decide entre su inclusión en el lisosoma o su reciclamiento a la membrana plasmática.

La β -arrestina, el receptor CXCR4 y la ubiquitina: un caso particular.

La endocitosis del receptor de quimiocinas CXCR4 (que además actúa como co-receptor en la internalización del VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) ha sido también extensivamente estudiada. Las primeras observaciones indicaban de nuevo que la ubiquitilación no es necesaria para su internalización, pero sí para su degradación en el lisosoma. La ubiquitina ligasa AIP4/Itch, también de la familia de Nedd4, es la enzima implicada [115, 116]. La β -arrestina-1 interacciona con AIP4 en los endosomas y es necesaria para la degradación del receptor. Sin embargo y de manera sorprendente, se pudo demostrar que la arrestina no toma partido en su ubiquitilación [23]. En este caso, el papel de la arrestina es el de posibilitar la ubiquitilación de

componentes de una maquinaria asociada al endosoma y necesaria para degradar el receptor; los complejos ESCRT (Endosomal sorting complex required for transport) [113]. La β -arrestina-1 al igual que la β -arrestina-2, carece de los motivos PY de interacción con ubiquitina ligasas de la familia de Nedd4. En el caso de la ubiquitilación del receptor CXCR4, se demostró que es capaz él mismo de reclutar directamente AIP4 mediante un motivo de interacción no descrito hasta entonces [24]. Hasta la fecha no se han identificado los determinantes que posibilitan el reclutamiento de la ligasa Nedd4 por las β -arrestinas.

Las nuevas arrestinas, que en realidad son las más antiguas.

Las β -arrestinas y las arrestinas visuales no comparten una homología de secuencia clara con proteínas de seres vivos que no pertenecen a los metazoos. Ello ha contribuido a que durante muchos años se aceptara que la presencia de arrestinas estaba limitada al reino animal. Esta concepción, sin embargo, tuvo que revisarse más tarde. Análisis bioinformáticos (PFAM) hicieron posible que dos estudios separados identificaran dominios arrestina N- y C-terminal en dos proteínas del hongo *Aspergillus nidulans*, CreD y PalF [71, 27].

Las primeras “nuevas arrestinas”.

Aunque CreD fue la primera proteína con dominios arrestina identificada fuera de los metazoos, no se profundizó en el estudio de su función [27]. En el estudio de PalF, sin embargo, además de la identificación de los dominios arrestina, se describió parte de su bioquímica y función. Las similitudes se establecieron a varios niveles y se hizo patente la utilidad de nuevos organismos modelo para el estudio de las arrestinas, así como el hecho de que su clasificación tradicional debía ser ampliada [71].

PalF es un elemento clave en la ruta de señalización por pH ambiental. PalF se une a dominios citoplásmicos de una proteína 7TM, PalH, lo que hace que quede ubiquitilada y fosforilada de forma dependiente del pH del medio. La inhibición de la interacción entre PalF y PalH interrumpe la transmisión de la señal de pH e impide el crecimiento en condiciones alcalinas. No parece que exista implicación de proteínas G en esta vía de señalización lo que sugiere que la función principal de esta nueva arrestina, en lugar de desensitización, sería la transmisión de la señal. En hongos, la ruta de señalización por pH ambiental está estrechamente relacionada con la endocitosis a través de la maquinaria de tráfico endosomal ESCRT. De este modo, los autores del estudio describieron la homología entre PalF y las β -arrestinas sobre distintas bases: homología secuencial y presencia de dominios arrestina; unión a una proteína 7TM que provoca modificaciones postraduccionales; y transducción de una señal extracelular mediante una ruta en la que participan proteínas relacionadas con la endocitosis [71].

La nueva clasificación de las arrestinas.

En un estudio filogenético posterior se identificaron como relacionadas con las arrestinas un gran número de proteínas. Se dividieron en tres familias: SpoOM (exclusiva de bacterias y arqueas), Arrestinas y Vps26 [2].

En mamíferos existe todo un árbol de arrestinas no reconocidas hasta entonces. Estas nuevas arrestinas tienen mayor homología con las descritas en hongo. Para ellas se propone el nombre de α -arrestinas. β -arrestinas y arrestinas visuales son miembros de una pequeña rama que emergió recientemente. Así, el nombre α -arrestinas es respetuoso con su filogenia [2].

Notablemente, existe otra familia de proteínas relacionadas con las arrestinas. Estudios previos revelaron que otra proteína, Vps26, tiene homología estructural con las arrestinas [38, 173]. Sin embargo, concluyeron que no existía homología de secuencia entre estas proteínas [173]. La comparación mediante PFAM de la secuencia de Vps26 con las de las nuevas arrestinas identificadas revela, según este estudio, que Vps26 y las arrestinas son verdaderos homólogos. Atendiendo a estos nuevos datos, el clan de las arrestinas está formado por 3 familias: familia de SpoOM, presente en arqueas y bacterias; familia de las arrestinas, que comprende dos subfamilias: arrestinas visual/beta (solo en metazoos) y α -arrestinas (eucariotas excepto plantas) y por último la familia de Vps26 que es la única incluida en plantas [2].

Las α -arrestinas.

A partir del descubrimiento de que existen otros miembros de la familia de las arrestinas (α -arrestinas) tanto en mamíferos como en hongos, empezaron a ser publicados varios trabajos que acometían su caracterización. La función de las α -arrestinas no parece estar implicada en la desensitización de receptores 7TM acoplados a proteínas G. Por el contrario, estas proteínas parecen ser elementos clave en la regulación de la endocitosis de transportadores de membrana. Estos descubrimientos expanden la concepción de las arrestinas como reguladores exclusivos de receptores 7TM acoplados a proteínas G. De hecho, varios artículos demuestran que incluso las β -arrestinas tienen otras funciones independientes de su asociación con 7TM clásicos. Por ejemplo, la β -arrestina-2 controla la endocitosis del receptor Smoothed (Smo) de la vía Hedgehog (Hh), implicada en el desarrollo de vertebrados. Basándose en ciertas similitudes entre esta ruta y la de pH en hongos, se ha propuesto que entre ambas pudiera existir una relación evolutiva [4]. Además, las β -arrestinas regulan proteínas de membrana distintas de los receptores 7TM como por ejemplo diversos canales iónicos [165].

Las α -arrestinas como adaptadores de ubiquitina ligasas.

La mayoría de los estudios de las α -arrestinas han usado como modelo la levadura *S. cerevisiae* [20]. En las últimas décadas, había quedado establecido que la ubiquitina es un regulador maestro de la endocitosis. En levadura, se comprobó que la ubiquitilación de proteínas de membrana tales como transportadores [91], receptores [77] o permeasas [52] es necesaria para su internalización y transporte al endosoma. Se ha encontrado también un caso donde el proceso de internalización es independiente de ubiquitina [182]. El modelo actual para este proceso sugiere que los cargos ubiquitilados son reconocidos por los dominios de unión a ubiquitina de proteínas endocíticas como Ede1 o Ent1/2. Estas proteínas endocíticas también unen clatrina, lo que les hace buenas candidatas para coordinar endocitosis y reconocimiento del cargo ubiquitilado.

En etapas posteriores, la ubiquitina puede definir la vía que el cargo seguirá. Por ejemplo, la inclusión de las proteínas cargo en vesículas internas del endosoma es fundamental para su degradación por la vacuola (el equivalente en hongos del lisosoma de metazoos). Este proceso está regulado por la maquinaria ESCRT. Varias de sus subunidades tienen dominios de unión a ubiquitina que reconocen esta molécula en el cargo y facilitan su inclusión en las vesículas. De este modo, la falta de ubiquitilación a este nivel, provoca que el cargo no se degrade en la vacuola y se recicle a la membrana plasmática. El estudio de las α -arrestinas ha aumentado

nuestra comprensión de estos procesos. Se ha hecho manifiesto que actúan como adaptadores entre la ubiquitina ligasa y la proteína sujeto de endocitosis.

Las α -arrestinas de levadura: las ARTs.

Las α -arrestinas de levadura han sido renombradas ART (Arrestin Related Trafficking adaptors) en un estudio en el que se identificaron 9 miembros de esta familia. Aunque cada una de estas proteínas tiene un nombre anterior a estos estudios, a lo largo de esta introducción se utilizará la nomenclatura ART para simplificar su clasificación (con la excepción de Rim8/Art9). En el estudio mencionado se abordó la caracterización funcional de Art1/Ldb19. Art1 es un regulador de la endocitosis del transportador de Arginina Can1 que puede, ante ciertos estímulos, participar en la endocitosis de otros transportadores de aminoácidos [106]. En una publicación paralela, se mostró que otras dos ARTs (Art2 y Art8) están específicamente involucradas en la endocitosis del transportador de manganeso Smf1 [127]. Los resultados de estos estudios sugieren que las ARTs no son específicas de un transportador o una familia de transportadores en particular, sino que su función está asociada a un tipo concreto de señal [106, 127]. De hecho, existen otros casos en los que se ha demostrado la implicación de las ARTs en la endocitosis de transportadores inducida por señales específicas [106, 127, 126, 66, 18].

El conjunto de estos estudios indica que las ARTs, median la ubiquitilación de los transportadores, haciendo de puente entre ellos y la ubiquitina ligasa, lo que recuerda a mecanismos similares de las β -arrestinas [171]. En estudios de localización se ha demostrado que Art1 se localiza en la membrana plasmática en respuesta a la señal que induce la endocitosis del transportador de aminoácidos Can1. [106, 112]. Además de en la membrana plasmática, las ARTs se han localizado también en compartimentos internos. Es el caso de Art6 y Art3. Estas dos proteínas controlan el tráfico del transportador general de aminoácidos Gap1 entre la red del trans-Golgi y el endosoma. En consonancia con esta observación, se observó que ambas interaccionan con clatrina y su adaptador específico de Golgi AP-1, lo que sugiere que las ARTs, al igual que las β -arrestinas, promueven la inclusión de proteínas cargo en vesículas recubiertas de clatrina [129].

Las ARTs, al igual que las β -arrestinas, se regulan por ubiquitilación y fosforilación.

Al igual que las β -arrestinas, las α -arrestinas son ellas mismas sujeto de ubiquitilación. En algunos casos (PalF, Art4) se ha demostrado que esta ubiquitilación está inducida por la señal [71, 18]. Aunque la función específica de la ubiquitilación de las ARTs no ha sido completamente entendida hasta la fecha, sí que se ha podido demostrar en varios estudios que es fundamental para su función. Versiones mutantes de las ARTs que no se pueden ubiquitilar, son incapaces de promover la internalización de los transportadores [106, 127, 18].

La regulación de las α -arrestinas recuerda a la de las β -arrestinas. Las β -arrestinas como se explicó anteriormente, son defosforiladas y ubiquitiladas al unir el receptor. La relación entre estas dos modificaciones no se ha resuelto. El acoplamiento entre estos dos procesos, sin embargo, sí que ha sido descrito para una de las ARTs. En respuesta a la señal de glucosa, Art4 se defosforila y se ubiquitila. La proteína kinasa Snf1 y la proteína fosfatasa de tipo 1 (PP1) controlan el estado de fosforilación de Art4, dependiendo de la presencia de glucosa en el medio. En su ausencia, Art4 se mantiene fosforilada, esto promueve su interacción con una

proteína 14-3-3 que la mantiene inactiva. Cuando existe glucosa disponible, Art4 se defosforila, lo que permite su ubiquitilación y activación [18]. Un caso diferente es el de Art1. Al igual que Art4, Art1 se fosforila y se ubiquitila, lo que regula su localización. Sin embargo, estos dos procesos no parecen estar acoplados [112].

ARRDCs, los homólogos de las ARTs en mamíferos.

Como se descubrió en el estudio filogenético antes mencionado, existe una subfamilia de arrestinas no caracterizadas en mamíferos. A estas 6 proteínas, con mayor homología con las ARTs que las β -arrestinas, se las denomina “Arrestin Domain Containing” (ARRDC) 1-5 y Txnip. Aunque recientemente descubiertas, ya se han publicado trabajos en los que se describen sus funciones, las cuales recuerdan a las de las ARTs. De este modo, no solo existiría una homología estructural entre las proteínas humanas y las de levadura, sino también funcional. ARRDC3 se aisló en una búsqueda de proteínas implicadas en la ubiquitilación y degradación del receptor β_2 adrenérgico [122]. Al igual que la β -arrestina-2 [169], ARRDC3 actúa de puente entre la ubiquitina ligasa Nedd4 y el receptor. Esto sugiere la interesante posibilidad de que ambos tipos de arrestinas puedan controlar de manera conjunta la ubiquitilación y degradación del receptor. El hecho de que ambos tipos de arrestinas tengan capacidad para dimerizar [121, 181], permite especular que heteroligómeros de ambos tipos de arrestinas pudieran generar nuevas posibilidades funcionales. En cuanto a la ubiquitilación de las propias ARRDCs, se ha observado que dos miembros de esta familia, ARRDC1 y TXNIP, son ubiquitiladas por ligasas de la familia de Nedd4 [149, 81].

Rim8/Art9, una ART implicada en una ruta de señalización.

Así como las β -arrestinas participan en rutas de señalización, lo mismo se ha descrito para una α -arrestina. El homólogo en *A. nidulans* de una de las proteínas ART, Rim8/Art9, es una proteína que ya se ha mencionado: PalF. PalF se regula por las mismas modificaciones postraduccionales que las β -arrestinas al unir un receptor 7TM [71]. Sin embargo, PalF, a diferencia de otras α -arrestinas, no regula la endocitosis de un transportador de membrana sino que permite la transducción de la señal de pH ambiental mediante su asociación con una proteína 7TM. Como se expresó anteriormente, la ruta *pal* está muy conservada en hongos. En *S. cerevisiae*, se denomina ruta *RIM*. Uno de sus componentes, Rim8, que fue llamado Art9 cuando se nominaron las ARTs, es el homólogo de PalF. Caracterizar su función es el objeto de esta tesis.

La ruta *pal/RIM*.

Muchas de las especies de hongos conocidas son capaces de reproducirse en un amplio rango de pH ambiental. Para conseguirlo, es fundamental que, además de mantener su homeostasis, adapten la expresión de sus proteínas expuestas, de tal modo que solo sean expresadas en las condiciones apropiadas; algunas de las proteínas en contacto directo con el pH extracelular, tales como permeasas o enzimas secretadas, solo funcionan de manera óptima en rangos estrechos de pH. La ruta *pal/RIM* es uno de los mecanismos encargados de esta regulación. Bajo su control se encuentra una gran variedad de genes. En *S. cerevisiae*, estos genes están implicados en la esporulación, crecimiento invasivo, captación y tolerancia a iones y estructura de la pared celular. Un ejemplo es el gen *ENA1*. *ENA1* se induce en condiciones alcalinas de manera, en parte, dependiente de la ruta *RIM*. *ENA1* codifica una bomba de cationes Na^+ -ATPasa que la levadura usa para adaptarse a altas

concentraciones de Li^+ , Na^+ o a pH alcalino [158] (esquemático en la Figura R-8). La capacidad de dividirse en presencia de Li^+ se usa como indicador de la actividad de la ruta *RIM*. Otro ejemplo (se podrían citar múltiples) es el del gen *DIT1*, implicado en esporulación. Rim101 participa en su represión uniéndose a un elemento del promotor de 42 pares de bases que actúa como regulador negativo (*NRE*) [155]. Una fusión de este elemento al gen testigo *lacZ* se usa también como indicador de la actividad de la ruta *RIM*.

Aunque en *A. nidulans* un fenotipo claro de la actividad mermada de la ruta *pal* es la incapacidad de reproducirse en condiciones alcalinas, en *S. cerevisiae* no se puede usar este indicador. Esto es probablemente debido a que en levadura existen otras rutas con una función importante en la respuesta a cambios de pH. Estas rutas incluyen la ruta mediada por calcio-calcineurina y Crz1, la vía de MAPK mediada por Slt2 y el sensor Wsc1 y quizá otro mecanismo dependiente de los reguladores de la meiosis Mds3 y Pmd1 (para revisión ver [3]).

La comprensión de la fisiología de esta ruta, muy conservada en los hongos, proviene de los estudios realizados en el hongo filamentoso *A. nidulans*, y se complementa de manera importante con los obtenidos en la levadura *S. cerevisiae*. Otras levaduras, como *Yarrowia lipolytica* y *Candida albicans* también han sido utilizadas como modelo de estudio.

La ruta *pal* en *Aspergillus nidulans*.

Se han encontrado siete genes implicados en la ruta *pal*: *palA*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH*, *pall* y *pacC* [4, 136, 139] (Figura I-3). El responsable de la regulación de la expresión génica dependiente de la ruta *pal* es el factor de transcripción PacC. La secuencia de PacC contiene tres dedos de zinc del tipo C2H2, de los cuales solo dos interactúan con el ADN. En condiciones ácidas, la forma completa de PacC es la predominante. PacC se mantiene en una conformación cerrada inactiva mediante interacciones intramoleculares [138, 74]. Por el contrario, en condiciones neutras-alcalinas sufre un procesamiento proteolítico en dos pasos que da lugar a su forma activa. El primero es dependiente de la señal de pH y escinde unos 180 residuos del extremo C-terminal. El segundo es catalizado por el proteasoma de manera independiente del pH. Este segundo corte elimina otros 245 residuos, respetando los dedos de zinc [74]. Esta forma activa de PacC deja al descubierto una secuencia de localización nuclear. Una vez en el núcleo, PacC actúa como represor de los genes expresados en condiciones ácidas y activador de los expresados en condiciones alcalinas.

PalH es una proteína 7TM que se localiza en la membrana plasmática [33]. Mediante su cola C-terminal, interactúa con PalF, una de las α -arrestinas ya descritas. Esta unión es fundamental para la transducción de la señal de pH [71]. Las similitudes entre esta interacción y las de las β -arrestinas con receptores 7TM, sugieren que PalH es un receptor de membrana responsable de sentir la señal de pH y transmitirla a través de su cola C-terminal citosólica. Pall es una proteína 3TM cuya función no es esencial, pero sí sustancial. Se ha demostrado que su papel en la ruta consiste en facilitar la localización en la membrana plasmática de PalH [33]. PalA y, sobre todo, PalB parecen más directamente implicados en el procesamiento de PacC. PalA interactúa con dos motivos YPXL presentes en PacC. Estos motivos flanquean la secuencia del primer corte proteolítico, dependiente del pH. PalB, una proteasa de tipo calpaína, es con mucha probabilidad la responsable de esta escisión. Se ha propuesto que la interacción entre PalA y PacC tenga la función de determinar el sitio de corte por PalB, exponiendo los sitios adecuados [195].

La función de PalC es la menos conocida en la ruta. De su posible papel se hablará más adelante, ya que antes es necesario describir algunos descubrimientos realizados en la ruta *RIM* en *S. cerevisiae*.

La descripción de PalF como una proteína de la familia de las arrestinas, sus modificaciones postraduccionales y su interacción con la proteína 7TM PalH, permitieron inferir el orden de actuación de los distintos componentes de la ruta (Figura I-3). La ubiquitilación y fosforilación de PalF es dependiente de la señal de pH y de PalH, pero independiente de PalA, PalB y PalC [71]. Por similitud con las β -arrestinas, se ha sugerido que las modificaciones de PalF sean un indicador del pH ambiental. Su ubiquitilación y fosforilación dependen parcialmente de Pall, lo que es coherente con su función en la localización de PalH. En este modelo, tomando como referencia la modificaciones de PalF, PalH y Pall funcionarían aguas arriba, mientras que PalA, PalB y PalC actuarían aguas abajo [71].

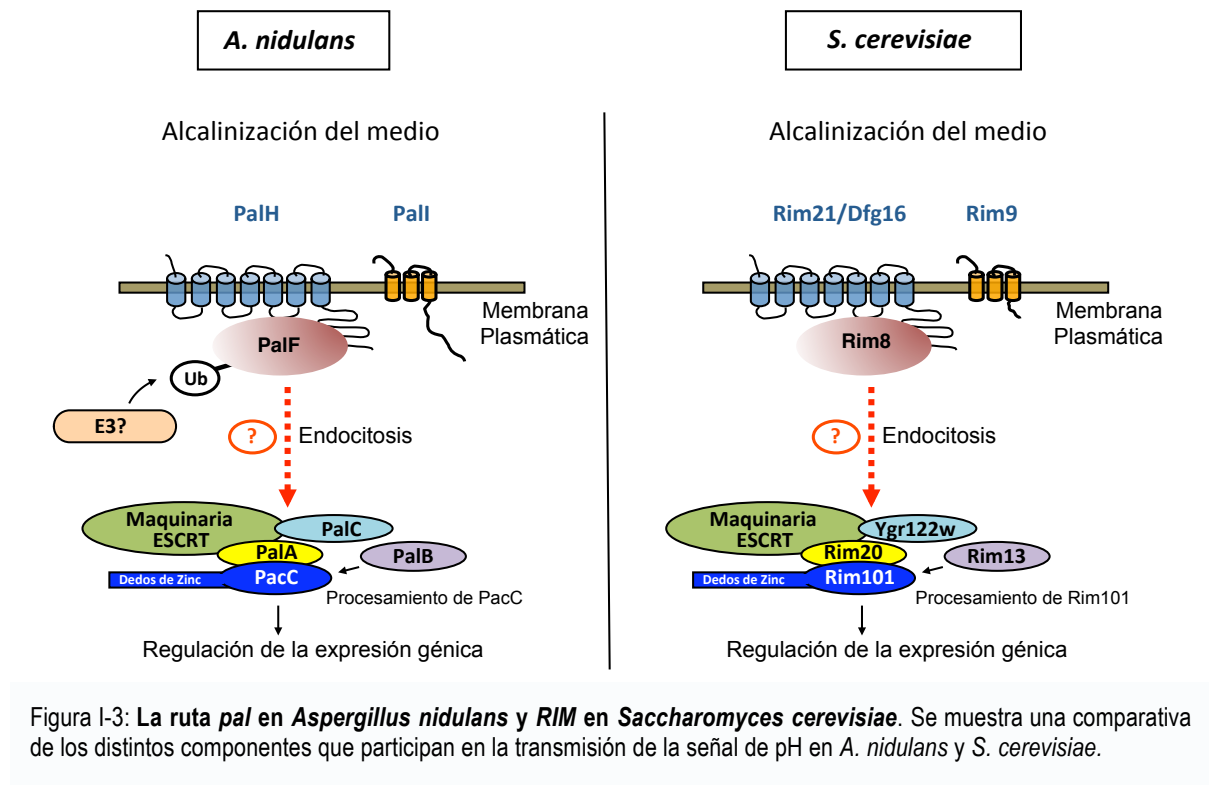


Figura I-3: La ruta *pal* en *Aspergillus nidulans* y *RIM* en *Saccharomyces cerevisiae*. Se muestra una comparativa de los distintos componentes que participan en la transmisión de la señal de pH en *A. nidulans* y *S. cerevisiae*.

La ruta *RIM* en *Saccharomyces cerevisiae*.

Estudiando los componentes de la ruta *RIM* en levadura, se han obtenido nuevas claves que conceptualmente, se dividen en dos bloques: 1) aunque la homología entre las rutas *pal* y *RIM* no admite duda, existen variaciones en el número de componentes y en los detalles de la mecánica; 2) existen proteínas cuya función es esencial, pero no exclusiva de la ruta.

Algunas de las características específicas de la ruta *RIM*.

Los componentes cuya función conocida está limitada a la ruta *RIM* son los siguientes: Rim8, Rim9, Rim13, Rim20, Rim21, Rim101, Dfg16 y Ygr122W [155, 105, 50, 203, 191, 17] (Figura I-3). Rim21 y Dfg16 son proteínas 7TM homólogas a PalH. Esta es una de las diferencias con la ruta en *A. nidulans* en la que solo existe una proteína 7TM. Rim8 es el homólogo de la arrestina PalF. Rim9, es homóloga a la proteína 3TM Pall y, a

diferencia de esta, tiene una función esencial en la transducción de la señal de pH. El factor de transcripción homólogo a PacC, Rim101, solo sufre un corte proteolítico, dependiente de pH y probablemente catalizado por la cisteína proteasa Rim13, el homólogo de PalB. Rim20, el homólogo de PalA, participa en el reclutamiento del factor de transcripción. La actividad directa de Rim101 es solo represora, aunque reprimiendo represores transcripcionales pueda generar respuestas activadoras.

Componentes cuya función no es exclusiva de la ruta *RIM*.

La primera pista de que componentes con otras funciones participan en la transmisión de la señal de pH provino de un estudio de interacción proteína-proteína a escala genómica. En él, se identificaron interacciones de Rim13 y Rim20 con Snf7, un componente de la maquinaria endosomal ESCRT [81]. Rim20 contiene un dominio Bro1 que media esta interacción [88]. La de Rim13 implica un mecanismo diferente a este [183] y al de su homólogo PalB, cuya interacción con otro de los componentes de ESCRT está mediada por un motivo MIT ausente en Rim13 [154]. Seguidamente, se demostró que no solo este, sino la mayoría de los componentes de ESCRT, son necesarios para el funcionamiento de la ruta *RIM* [204]. El descubrimiento de que proteínas endosomales son elementos clave en la transducción de la señal de pH tiene implicaciones que conciernen al modelo propuesto para su organización espacial. Estas se comprenden mejor si antes se introducen algunas nociones de la endocitosis en levadura.

Aspectos generales de la endocitosis en levadura.

En células de mamífero, las proteínas endocitadas transcurren, en su viaje hacia el lisosoma, por una serie de compartimentos caracterizados por la presencia de marcas proteicas de membrana; los denominados endosoma temprano y endosoma tardío. En levadura, la situación difiere, ya que no parece que estos compartimentos “discretos” estén presentes. Se suele usar el término “endosoma prevacuolar” (PVE) para denominar un compartimento en el que pueden encontrarse características propias de diferentes estados de maduración. Una de sus marcas es la presencia de la syntaxina endosomal t-SNARE (las t-SNARE anclan membranas interactuando con las v-SNARE [102]) Pep12 [137]. Durante su maduración, su membrana se enriquece en el fosfolípido fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) [57]. Los PVE evolucionan a cuerpos multivesiculares (MVB) mediante invaginaciones de su membrana que acaban separándose y generando vesículas internas. Los MVE se fusionan con el equivalente en levadura al lisosoma: la vacuola. En ella, enzimas hidrolíticas degradan tanto los lípidos como las proteínas incluidas en las vesículas luminales (ILV). Este es un proceso clave en la fisiología celular, ya que de él dependen procesos como la remodelación del acervo proteico de la membrana plasmática y el silenciamiento de señales desencadenadas por receptores de membrana. La maquinaria responsable de la clasificación, agrupamiento e internalización de los cargos en estas vesículas es un complejo multiproteico del que ya se ha hecho mención; ESCRT [80].

El estudio de esta maquinaria en la levadura *S. cerevisiae* no ha sido solo fundamental en la comprensión de los mecanismos subyacentes a la “ruta del cuerpo multivesicular” sino que ha llevado a una visión ampliada de sus funciones. La ruta *RIM* da cuenta de esta expansión e incluye la participación en rutas de señalización entre las funciones conocidas de ESCRT. Este hecho es el responsable de que fuera conveniente introducir la endocitosis en hongos.

Además de embebidas en vesículas procedentes de la membrana plasmática, las proteínas pueden acceder al endosoma directamente desde el Golgi, a través de vesículas de la ruta biosintética. [28, 151, 75]. Existen, además, vías de reciclaje, aunque todavía se comprenden de un modo muy limitado. De estas, la mejor conocida contiene un compartimento llamado endosoma post-Golgi, que recibe tráfico desde la membrana plasmática y desde el Golgi [137].

Consecuencias del descubrimiento de la implicación de ESCRT en la ruta Rim.

Un modelo, sugerido a la luz de estos descubrimientos, propone que la ruta *RIM* está dividida en dos complejos: un complejo sensor de pH en la membrana plasmática y un complejo procesador de Rim101 situado en el endosoma (Figura I-3). Los siguientes datos en *A. nidulans* y *S. cerevisiae* se sugieren como apoyo para este modelo: 1) homología del sistema PalH-PalF con el sistema receptor 7TM- β arrestina, internalización del receptor en mamíferos [71, 33]; 2) localización endosomal de Rim20 en respuesta a la señal de pH [30]; 3) interacciones de Rim20 y Rim13 con Snf7 de ESCRT-III [81]; 4) activación parcial constitutiva de Rim101 en mutantes en los cuales los genes que codifican los componentes Vps2 y Vps24 de ESCRT-III han sido eliminados, este efecto suprime parcialmente las mutaciones de delección de *RIM8*, *RIM9* y *RIM21*, pero no las de *RIM20* y *RIM13* [67].

Todas estas observaciones encajan en un modelo en que la ruta *RIM* está dividida en dos subcomplejos espacialmente separados. El complejo sensor de pH en la membrana plasmática estaría formado por Rim21/Dfg16, Rim9 y Rim8. La alcalinización del medio activaría los receptores Rim21 y Dfg16 y provocaría la ubiquitilación y fosforilación de Rim8 (datos obtenidos de su homólogo PalF). Esta información sería transmitida al complejo de procesamiento. El complejo endosomal de procesamiento de Rim101 estaría formado por Rim20, Rim13, Rim101 y por los complejos ESCRT (a excepción de ESCRT-0 y de Vps2 y Vps24; una explicación detallada de la dinámica y organización de ESCRT será incluida a continuación de esta sección). De manera dependiente de pH, Rim20 reclutaría el factor de transcripción uniéndolo en sus motivos YPXL y fijándolo en una plataforma endosomal constituida por la polimerización del componente de ESCRT-III, Snf7. Rim13 procedería entonces al procesamiento proteolítico de Rim101. Aunque la conexión entre estos dos complejos (y, de hecho, su propia existencia) es actualmente motivo de controversia, se ha sugerido la endocitosis como responsable de su enlace. A pesar de todas las evidencias, no se ha comprobado de manera irrefutable la veracidad de este modelo. La incertidumbre creció cuando se descubrió que los ESCRT pueden ser reclutados a otros destinos celulares. Por ejemplo, los retrovirus en su proceso de evaginación, reclutan componentes de esta maquinaria a la membrana plasmática. Allí, se generan vesículas hacia el exterior celular en las que se incluyen partículas víricas [55]. Sería concebible que en la ruta *RIM* el reclutamiento de ESCRT y procesamiento de Rim101 tuviera lugar, asimismo, en la membrana plasmática [34]. Las distintas posibilidades serán tomadas en consideración durante la discusión incorporando datos generados en esta tesis.

Ygr122w es el homólogo en levadura de PalC, cuya función se presentó como la menos caracterizada. Los datos de PalC podrían interpretarse de distintas maneras y considerarse favorables por los partidarios de cualquiera de los dos modelos. PalC se recluta a estructuras corticales de manera dependiente de PalH [54]. Además, PalC tiene un dominio Bro1 que interacciona con Snf7. Esta interacción es fundamental para la ruta

[54, 189]. Por ello se ha propuesto que PalC tenga una función mediadora entre los dos subcomplejos e incluso que facilite el acercamiento de endosomas ricos en Snf7 a las regiones de la membrana plasmática donde PalH y PalF interaccionan. Esta última proposición, sin embargo, debe tener en cuenta el hecho de que PalC no se ha observado en endosomas.

La comprobación de que ESCRT participa en la ruta *RIM* se realizó años después de conocer los componentes *pal* de la ruta en *A. nidulans*. Este desfase cronológico se debe, con mucha probabilidad, a que en *A. nidulans*, al contrario que en levadura, los mutantes nulos de ESCRT no son viables. Esta situación se ha aclarado recientemente; usando cepas con mutaciones adicionales que rescatan la viabilidad, se ha demostrado que componentes de ESCRT-I, -II y -III son fundamentales también en la ruta *pal* [34] (Figura I-3).

La maquinaria ESCRT

Los complejos ESCRT fueron descubiertos por su participación en la formación de los cuerpos multivesiculares. Como se explicó anteriormente, son los encargados de la degradación de proteínas de membrana; proceso que llevan a cabo mediante la formación de vesículas de su propia membrana hacia su propio lumen y posterior fusión con la vacuola. Los MVB fueron descritos por primera vez en la década de 1950 como “dos grandes vesículas con vesículas más pequeñas en su interior” [134, 179]. Más adelante, en la década de 1970, se observó que el receptor del factor de crecimiento epidérmico se introducía en pequeñas vesículas similares a las descritas en el MVB [62]. El descubrimiento de la maquinaria responsable de estas funciones tuvo que esperar hasta la década de los 2000. En una serie de publicaciones consecutivas quedó demostrado que la maquinaria ESCRT está formada por 5 complejos multiproteicos (ESCRT-0, -I, -II, -III, y Vps4) que participan en la ruta del MVB. Estos reconocen proteínas ubicuitiladas, las agrupan y las incluyen en las ILV cuya formación promueven ellas mismas. De este modo, quedó definida la función “clásica” de los complejos ESCRT [9, 11, 10, 83].

A partir de esos descubrimientos, la función de los ESCRTs se expandió a otros procesos tales como la división de células animales, gemación de los retrovirus y autofagia [36, 48]. La visión actual concibe los ESCRTs como una maquinaria que, mediante adaptadores, puede ser reclutada para realizar diferentes funciones celulares que, en general, requieren reconocimiento de proteínas y deformación y escisión de membranas. Además de estos procesos, que comparten ciertas características de la función de ESCRT, esta maquinaria participa en la activación de, al menos, una ruta de señalización en hongos. La diversidad de funciones implica a subunidades particulares en cada caso. Por ejemplo, algunas subunidades de ESCRT-III así como el complejo ESCRT-0 son prescindibles en la ruta *RIM* [67] y, entre otros, ESCRT-II no tiene función conocida en la gemación de los retrovirus [98].

Los complejos ESCRT

Los ESCRTs se definieron inicialmente como una vía de clasificación de proteínas dependiente de ubiquitina en levadura. Existían diversos genes que, cuando se eliminaban, generaban fenotipos asociados a un defecto de tráfico hacia la vacuola, los llamados *VPS* (Vacuolar Protein Sorting). Se los dividió en 3 grupos iniciales por la morfología de la vacuola: clase A, B y C [15]. Luego se definió un cuarto grupo; “clase E” porque sus miembros exhibían un compartimento peculiar derivado del endosoma [150]. Mediante técnicas bioquímicas

y de biología molecular se demostró que las proteínas “clase E” median el transporte de proteínas integrales de membrana al MVB, así como la formación de este compartimento. Los subcomplejos que forman estas proteínas se llamaron ESCRT-0, -I, -II, -III, y Vps4 y se demostró que para realizar su función, se reclutan desde el citoplasma a la membrana del endosoma de manera secuencial (Figura I-4) [9, 11, 10, 83, 5, 174].

La conservación evolutiva hace su fisiología y mecánica extensible a otros organismos, teniendo en cuenta algunas consideraciones: en mamíferos, existen diferentes isoformas para algunos componentes. Algunas de las interacciones conservadas, se realizan por mecanismos diferentes; organismos tan alejados como las arqueas contienen ya ortólogos de algunos complejos ESCRT (ESCRT-III y Vps4) que funcionan en la división celular [163]. Ya que esta maquinaria se ha caracterizado sobre todo en *S. cerevisiae*, la descripción de los complejos ESCRT se limitará a esta especie.

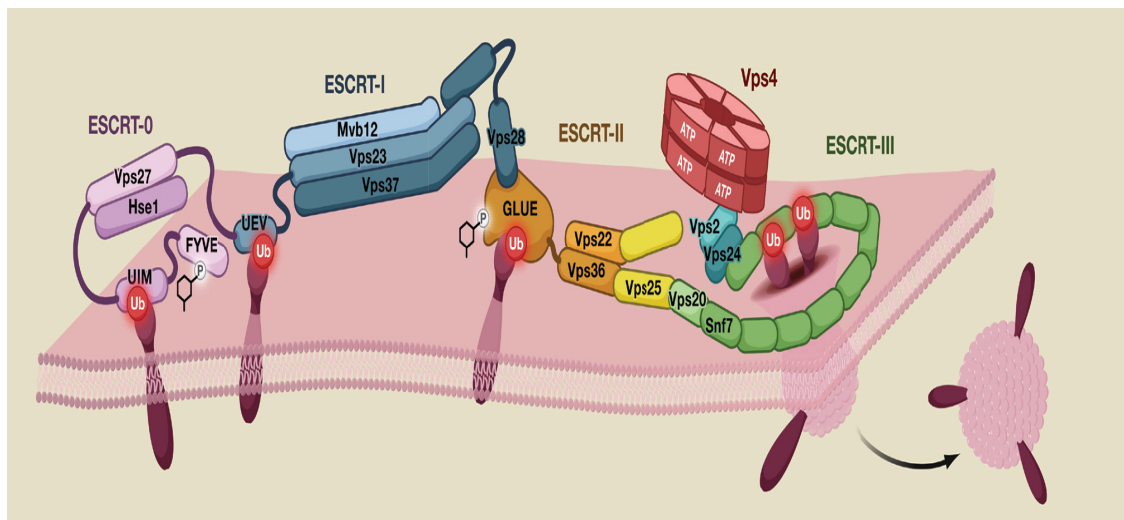


Figura I-4: **Modelo de la maquinaria ESCRT ensamblada en la membrana del endosoma.** Tomado y modificado de Teis *et al.* [184] Vps27 reconoce el lípido PI3P en la membrana del endosoma, provocando el ensamblaje del complejo Vps27–Hse1, también llamado ESCRT-O. ESCRT-O reconoce el cargo ubiquitilado (Ub) y recluta el complejo ESCRT-I interaccionando con Vps23. Una vez en la membrana, el dominio UEV de Vps23 une el cargo ubiquitilado. La subunidad Vps28 de ESCRT-I recluta ESCRT-II. Una vez en la membrana, ESCRT-II promueve el ensamblaje del complejo ESCRT-III, formador de las vesículas. Finalmente, una vez el cargo ha sido incluido en las vesículas del MVB, la ATPasa Vps4 desensambla los complejos.

ESCRT-O: Consta de dos subunidades preensambladas: Vps27 y Hse (Figura I-4). Interaccionan a razón de 1:1 mediante un dominio GAT [5, 146]. Aunque son estructuralmente similares, solo Vps27 contiene un dominio FYVE de dedos de zinc [114]. Este dominio une el lípido específico del endosoma PI3P, lo que confiere a ESCRT-O la capacidad de reclutarse de manera selectiva a esta membrana [147]. Además, ambas subunidades contienen dominios de unión a ubiquitina (VHS y UIM) que reconocen cargos ubiquitilados [25]. Estas dos características confieren a ESCRT-O la capacidad de iniciar la cascada de reclutamiento en la membrana del endosoma. A continuación se recluta ESCRT-I.

ESCRT-I: Solo tiene capacidad intrínseca de unir membrana con baja afinidad [92], por ello su reclutamiento requiere ESCRT-0 [82]. Está formado por una unidad de Vps23, Vps28, Vps37 y Mvb12 (Figura I-4). Su estructura cristalina lo muestra como un heterotetrámero alargado formado por tres subunidades

entrelazadas y una cuarta que sobresale como un apéndice globular formado por la parte C-terminal de Vps28 [92]. ESCRT-I interacciona con ESCRT-0 y con ESCRT-II por cada extremo. La interacción con ESCRT-0 está mediada por un dominio UEV (ubiquitin E2 variant) que sobresale y reconoce motivos de tipo PSDP en Vps27 de ESCRT-0 [82, 93]. Además, este mismo dominio reconoce la ubiquitina del cargo (Figura I-4). La doble interacción de ESCRT-I con el cargo y ESCRT-0 facilita la transferencia del cargo entre los complejos. Esta interacción es imitada por proteínas Gag retrovirales para reclutar ESCRT en el proceso de gemación viral [144].

ESCRT-II: Además de con ESCRT-0, ESCRT-I interacciona con ESCRT-II. Este complejo es un heterotetrámero en forma de “Y” constituido por una unidad de Vps22, una de Vps36, que forman la base de la “Y” y dos de Vps25 que forman sus extremos (Figura I-4) [10, 98]. Vps36 contiene un dominio GLUE que interacciona con gran afinidad con el extremo C-terminal de Vps28 de ESCRT-I [56, 186]. Insertados en este dominio se encuentran dos dominios NZF, uno de los cuales une ESCRT-I y el otro ubiquitina [186]. Además, este dominio GLUE en humanos, une con gran afinidad PI3P [176], lo que confiere también a esta subunidad de ESCRT la especificidad por la membrana del endosoma. ESCRT-II actúa como iniciador de la polimerización de ESCRT-III mediante una interacción de alta afinidad entre Vps25 y Vps20 de ESCRT-III.

ESCRT-III: Al contrario que los otros ESCRT, que se reclutan como complejos preformados desde el citoplasma, las subunidades de ESCRT-III se reclutan individualmente. Por el momento no se ha podido cristalizar el complejo entero. Está formado por 4 subunidades de estructura similar: Vps20, Snf7, Vps24 y Vps2 (Figura I-4) [11]. En el citoplasma, interacciones intramoleculares mantienen las subunidades en una conformación autoinhibida. ESCRT-III se activa cuando la subunidad Vps25 de ESCRT-II se une a Vps20, lo que inicia el reclutamiento al endosoma y formación del complejo [187]. Vps20, seguidamente, recluta Snf7, que homo-oligomeriza. Esta oligomerización parece terminada por el reclutamiento de Vps24 que recluta a su vez Vps2, lo que termina de ensamblar el complejo [161] (Figura I-4).

Proteínas accesorias a ESCRT-III. Además de las que forman el núcleo de ESCRT, existen proteínas reguladoras de su función. Bro1 es una de ellas. Interaccionando con Snf7, recluta la deubiquitilasa Doa4 [132, 110]. Como se expuso anteriormente, la maquinaria ESCRT reconoce proteínas ubiquitiladas y esta modificación es fundamental para que los cargo completen la ruta del MVB. Como consecuencia, antes de ser introducidas en las ILVs para su degradación, la ubiquitina debe ser recuperada. De lo contrario, las reservas de ubiquitina de la célula se verían reducidas. De hecho, una estrategia que se usa para obtener mutantes con cantidades bajas de ubiquitina consiste en usar mutantes defectivos de Doa4.

Bro1 no forma parte de las proteínas implicadas en la transducción de la señal de pH. En su lugar, Rim20, que contiene un dominio Bro1, interacciona con Snf7 y recluta Rim13, otra cisteín proteasa (las deubiquitilasas son cisteín proteasas) que en lugar de escindir la ubiquitina, produce el corte proteolítico de Rim101 [195, 50, 203]. El mecanismo por el que se reclutan estos componentes a ESCRT-III dependiendo de la función apropiada, está todavía por definir.

Vps4: Una vez ensamblado, el complejo ESCRT-III requiere energía para desasociarse de la membrana. Esta energía la aporta una ATPasa AAA de clase I, Vps4 (Figura I-4) [12]. Vps4 actúa como motor molecular.

Mediante un dominio MIT, interacciona con motivos MIM (MIT interacting motif) en las subunidades de ESCRT-III [9, 164]. Su estructura predicha sería la de un dodecámero formado por dos anillos hexaméricos [164]. Con ellos se asocia la proteína Vta1 [206]. La actividad ATPasa es necesaria para desensamblar ESCRT-III y completar el ciclo de los ESCRT. Esta actividad se desencadena, asistida por Vta1, cuando se forma el complejo de Vps4 y se asocia al oligomero de ESCRT-III. En un modelo propuesto, la interacción con ESCRT-III y la actividad ATPasa actuarían haciendo pasar a las proteínas por el poro delimitado por el anillo del complejo Vps4, desmantelando su plegamiento y deshaciendo la asociación entre las subunidades [70].

En lo concerniente a la ruta Rim, se ha observado que las cepas deficientes en Vps4 procesan Rim101 de manera constitutiva, probablemente porque la plataforma de ESCRT-III donde se proteoliza se ensambla constitutivamente [67].

Formación de las vesículas

La curvatura de la membrana que requiere el tipo de vesículas generadas por ESCRT difiere topológicamente de la necesaria en otros procesos clásicos. Por ejemplo, en la formación de vesículas recubiertas de clatrina, la membrana se curva hacia el citosol, lo que permite que moléculas internas la puedan recubrir. El caso de las ILV y las vesículas víricas es diferente, ya que la evaginación se dirige hacia fuera del citosol. Con esta topología, las proteínas de ESCRT, que son citosólicas, no pueden recubrir la vesícula en formación. Este fenómeno ha requerido una investigación exhaustiva y solo desde hace poco se han empezado a comprender sus detalles mecánicos.

En un artículo reciente se han definido los cambios conformacionales que activan Snf7 de ESCRT-III y se ha mostrado *in vitro* cómo se ensambla en protofilamentos espirales bidimensionales. Cuando estos investigadores añadían las subunidades Vps24 y Vps2, la espiral se transformaba en una hélice tridimensional que esculpía la vesícula. En el modelo que se propone, el polímero de Snf7 rodea las proteínas cargo capturadas por ESCRT-II y luego evoluciona hacia una espiral que forma una vesícula en la que el cargo queda incluido [69]. En otro artículo reciente se propone, basándose en datos estructurales, que el supercomplejo formado por ESCRT-I y -II además de agrupar los cargo y reclutar ESCRT-III, inicia y estabiliza el cuello de la vesícula en formación [29].

¿Cómo se seleccionan y reclutan las proteínas que seguirán la vía ESCRT?

Como se comentó cuando se introdujo la ubiquitilación como modificación postraducciona, esta puede dar lugar a distintos tipos de cadena según el residuo de lisina de la ubiquitina que reciba la siguiente ronda de reacción. Las modificaciones en K63 se relacionan con procesos no degradativos como tráfico endocítico (revisado en [101]).

Además de cadenas en K63, se ha demostrado que la adición de una única molécula de ubiquitina (monoubiquitilación) también participa en fenómenos de tráfico, aunque en distintas etapas. Por ejemplo, la permeasa Gap1 monoubiquitilada se internaliza con una frecuencia normal, pero se recicla con más eficiencia [100]. Diversos estudios han demostrado que la monoubiquitilación es suficiente para iniciar la endocitosis [109], pero para seguir la vía de los ESCRT y degradar la proteína cargo en la vacuola son necesarias las cadenas en K63 [100, 45]. Este tipo de modificaciones, quizá por su conformación abierta que expone determinantes

moleculares, permiten a los dominios de unión a ubiquitina de los ESCRT reconocer y agrupar los cargo facilitando su inclusión en las ILV.

En levadura, la E3 responsable de los procesos de tráfico de proteínas de membrana es Rsp5, una ubiquitina ligasa de tipo HECT que de manera preferencial crea cadenas en K63 [85]. Sorprendentemente, algunos sustratos aparecen monoubicuitilados y, como se expuso previamente, se ha descrito que esta modificación puede tener papeles fisiológicos distintos a los de las cadenas de ubiquitina. La monoubicuitilación de un sustrato por una E3 que *per se* genera cadenas en K63 plantea un problema fisiológico que se está empezando a resolver en la actualidad.

Mecanismos para generar una proteína monoubicuitilada.

Enzimas tipo HECT: monoubicuitilación acoplada.

El caso mejor estudiado es el de la proteína de mamíferos Eps15. En estudios de ubiquitilación *in vitro* se observó que el extremo C-terminal de esta proteína es necesario para su ubiquitilación [143, 90]. Esta región contiene dos motivos de interacción con ubiquitina UIM1 y UIM2. La enzima implicada es Nedd4, uno de los homólogos de Rsp5 en mamíferos. Estas enzimas de tipo HECT reconocen sus sustratos uniéndose a motivos PY. Sin embargo, Eps15 no tiene motivos PY y “suple” esta carencia mediante su motivo UIM2. Este motivo interacciona con una ubiquitina conjugada a Nedd4 (en un sitio diferente al catalítico), lo que recluta la ligasa. Esta interacción acerca el residuo de lisina de Eps15 al sitio catalítico de Nedd4, que le permita la transferencia de la ubiquitina. Para explicar que Eps15 solo reciba una ubiquitina, se propone un modelo autoinhibitorio, que todavía no se ha podido demostrar. Según él, el motivo UIM2 pasaría a unir en *cis* la ubiquitina conjugada a Eps15, lo que acabaría con el reclutamiento de Nedd4 y dejaría a Eps15 monoubicuitilada [200].

Enzimas tipo RING: Monoubicuitilación por inhibición de la unión a ubiquitina

En el caso de las E2 que funcionan con E3 tipo RING, se ha propuesto que la elongación tenga lugar en dos pasos. Para añadir la primera molécula bastaría con la interacción lábil entre la E2 y residuos cercanos a la lisina aceptora. Pero, para añadir sucesivas moléculas, la E2 tendría que unir la ubiquitina conjugada para colocar la lisina en una posición que le permita añadir la siguiente [148]. Interfiriendo con esta interacción de diversas formas, se puede regular negativamente la elongación de la cadena, obteniendo así proteínas monoubicuitiladas. Un caso sería el de la E2 Rad6 que contiene un sitio adicional de unión a ubiquitina necesario para extender la cadena sobre el sustrato PCNA. Cuando Rad6 funciona en conjunto con la E3 Rad18, esta última compite con la ubiquitina por unir ese sitio alternativo. Esto impide que Rad6 una la ubiquitina conjugada con el sustrato, impidiendo la elongación y resultando en que PCNA quede monoubicuitilado [76].

OBJETIVOS

Objetivos

Los objetivos de esta tesis doctoral son:

1. Investigar la conexión entre el complejo sensor de pH ambiental y el complejo de procesamiento del factor de transcripción Rim101 así como el posible papel de Rim8 en este proceso.
2. Estudiar la posible modificación postraduccional de Rim8 por ubiquitina y su impacto en la transmisión de la señal.
3. En el caso de detectar que Rim8 se ubiquitila: detallar los mecanismos moleculares implicados en la ubiquitilación de Rim8 así como los elementos que en *cis* y en *trans* posibilitan esta modificación.
4. Analizar la localización subcelular de Rim8 y de otras proteínas partícipes de la ruta de señalización *RIM* así como la posible variación de su localización en función de la activación de la ruta por cambio de pH ambiental.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y métodos

Medios y condiciones de cultivo.

Medios de cultivo para *Saccharomyces cerevisiae*.

Los cultivos en medio sólido o líquido, se realizaron a 30 °C. A los cultivos en medio líquido, se les inoculó con un precultivo al que se dejó alcanzar la fase estacionaria. Estos cultivos se mantuvieron con una agitación de 250 r.p.m. hasta que alcanzaron la fase logarítmica de crecimiento.

Medio Mínimo (SD)

Para preparar el medio líquido se usó una solución de D-glucosa al 2% en agua destilada, y para el medio sólido se añadió agar al 2% final (p/v). Posteriormente se autoclavó a 121 °C durante 20 minutos y se añadió 1:10 (v/v) de YNB 10X. Finalmente, se añadieron los aminoácidos complementarios necesarios en cada caso.

YNB 10X : Cada medio litro contiene: 8,5 g de YNB ["Yeast Nitrogen Base w/o amino acids and ammonium sulfate" (Gifco)], 25 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 2,9 g de mezcla de aminoácidos. Se disolvió la mezcla en agua destilada y se esterilizó por filtración.

Mezcla de aminoácidos

L-Isoleucina:	1,5 g
L-Arginina HCl:	1 g
L-Fenilalanina:	2,5 g
L-Valina:	7,5 g
L-Lisina HCl:	1,5 g
L-Treonina:	10 g
L-Adenina hemisulfato:	2,5 g
L-Metionina:	1 g
L-Tirosina:	1,5 g

Aminoácidos complementarios: los aminoácidos requeridos según la auxotrofia de las cepas utilizadas se prepararon a una concentración 100X y se añadieron en el medio. Se esterilizaron previamente por filtración.

L-Uracilo:	2 g/l	L-Histidina HCl monohidrato:	2 g/l
L-Triptófano:	2 g/l	L-Leucina:	10 g/l

Medio Completo (YPDA)

Cada litro contiene: 20 g de peptona, 10 g de extracto de levadura y 200 mg de adenina. El medio se autoclavó durante 20 minutos a 121 °C. Una vez autoclavado, se añadió glucosa al 2% final. Para hacer medio sólido se añadió agar al 2% final (p/v).

Medios para *Escherichia coli*.

Para el cultivo y mantenimiento de cepas transformadas se utilizó LB [162]. Se compone de: bacto triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 5 g/l. El pH se ajustó a 7,5 con NaOH y se añadió agar al 1,5 % (p/v) para el medio sólido. Finalmente fue esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Para seleccionar las bacterias resistentes a ampicilina en medio sólido o líquido, se añadió la sal sódica de este antibiótico (Sigma) a una concentración final de 100 µg/ml. Para transformantes resistentes a kanamicina, se añadió este antibiótico (Sigma) a una concentración final de 50 µg/ml.

Cepas de microorganismos utilizadas.

Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Las cepas utilizadas se describen en la tabla 1

Tabla 1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Cepa	Característica relevante	Genotipo	Referencia
Y00000	Silvestre Euroscarf (fondo BY4742)	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf
MHY501	Silvestre <i>DOA4</i>	<i>MATα DOA4 his3Δ200 leu2-3, 112 ura3-52 lys2-801 trp1-1</i>	[135]
MHY623	<i>Δdoa4</i>	<i>MATα doa4::LEU2 his3Δ200 leu2-3,112 ura3-52 lys2-801 trp1-1</i>	[135]
23346c	Silvestre <i>NPI1</i>	<i>MATα NPI1 ura3</i>	[68]
27038a	<i>npi1</i>	<i>MATα npi1 ura3</i>	[68]
Y04414	<i>Δrim8</i> (fondo BY4741)	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YGL046w::kanMX4</i>	Euroscarf
Y01150	<i>Δrim21</i> (fondo BY4741)	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YNL294c::kanMX4</i>	Euroscarf
Y11806	<i>Δdfg16</i> (fondo BY4742)	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YOR030w::kanMX4</i>	Euroscarf
Y06196	<i>Δrim9</i> (fondo BY4741)	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YMR063w::kanMX4</i>	Euroscarf
Y03416	<i>Δvps23</i> (fondo BY4741)	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YCL008C::kanMX4</i>	Euroscarf
Y07333	<i>Δrim20</i> (fondo BY4741)	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YOR275c::kanMX4</i>	Euroscarf
Y04752	<i>Δygr122w</i> (fondo BY4741)	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YGR122W::kanMX4</i>	Euroscarf
Y00936	<i>Δrim101</i> (fondo BY4741)	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YHL027w::kanMX4</i>	Euroscarf
Y06643	<i>Δrim13</i> (fondo BY4741)	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YMR154c::kanMX4</i>	Euroscarf
OVY25	<i>Δrim8 Rim101-3HA</i>	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YGL046W::kanMX4 RIM101-HA::LEU2</i>	Este trabajo

OVY121	<i>Δrim8 VPS28-3Flag</i> (fondo BY4741)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YGL046w::kanMX4 VPS28-3FLAG::HIS3</i>	Este trabajo
CTY10.5d	Doble-híbrido	<i>MATa ade2-101 his3Δ200 leu2Δ1 trp1Δ901 gal4 gal80 URA3::lexAop-lacZ</i>	[16]
W303-1A	Silvestre	<i>MATa ura3 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 ade2-1 can1-100</i>	Cepa común de laboratorio
SUB280	<i>CUP1-Ub</i>	<i>MATa ubi1-Δ1::TRP1 ubi2-Δ2:ura3, ubi3-Δub-2 ubi4-Δ2::LEU2 (pUB39-Ub) (pUB100) lys2-801 leu2-3112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-1(am)</i>	[178, 44]
SUB413	<i>CUP1-UbK63R</i>	<i>MATa ubi1-Δ1::TRP1 ubi2-Δ2:ura3, ubi3-Δub-2 ubi4-Δ2::LEU2 (pUB39-UbK63R) (pUB100) lys2-801 leu2-3112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-1(am)</i>	[178, 44]
SUB280- <i>vps23Δ</i>	<i>vps23Δ CUP1-Ub</i>	<i>MATa lys2-801 leu2-3, 112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-1 ubi1-Δ1::TRP1 ubi2-Δ2:ura3 ubi3-Δub-2 ubi4-Δ2::LEU2 [pUB39 2μ, pCUP1:Ub, LYS2] [pUB100=ubi1, 2μ, HIS3] vps23::kanMX4</i>	[178, 44]
SUB413- <i>vps23Δ</i>	<i>vps23Δ CUP1-UbK63R</i>	<i>MATa lys2-801, leu2-3,112, ura3-52, his3-Δ200, trp1-1 ; ubi1-Δ1::TRP1, ubi2-Δ2::ura3, ubi3-ΔUb-2, ubi4-Δ2::LEU2 [pUB39 derivada: 2μ, pCUP1:Ub(K63R), LYS2] [pUB100=ubi1, 2μ, HIS3] vps23::kanMX4</i>	[178, 44]
OVY172	<i>RIM8-3XGFP</i> (locus <i>RIM8</i>) (fondo BY4741)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YGL046W-3XGFP</i>	Este trabajo
OVY137	W3031A <i>ADH1-RIM9</i> <i>ADH1-RIM8-mCherry</i> <i>ADH1-DFG16 ADH1-RIM21-GFP</i>	<i>MATa ura3-1 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 ade2-1 can1-100 TRP1::ADH1-RIM9 HIS3::ADH1-RIM8-mCherry URA3::ADH1-DFG16 LEU2::ADH1-RIM21-GFP</i>	Este trabajo

- La cepa OYV25, que expresa Rim101 etiquetado con un triple epítipo HA se obtuvo mediante transformación de la cepa parental Y04414 con el vector pKR41 [155] digerido con Nco1 y Pst1 y reemplazamiento génico del gen *RIM101* por el alelo *RIM101-3HA*. Los transformantes se seleccionaron en medio mínimo SD en ausencia de leucina.

- La cepa OYV121, que expresa Vps28 etiquetado con tres epítopos Flag desde su propio locus, se obtuvo por el método de “reemplazamiento génico por PCR”. Para ello, la cepa parental Y04414 (*Δrim8*) fue transformada con un fragmento de PCR generado usando como molde el plásmido pFA6a-3Flag-His3MX6 [49] y amplificándolo con los oligonucleótidos OV493-OV494. Los transformantes se seleccionaron en medio mínimo SD en ausencia de histidina.

- La cepa OYV172, que expresa desde su propio locus Rim8 etiquetado con triple GFP, se generó en dos pasos. Primero, se generó una cepa *Δrim8::URA3* por reemplazamiento génico de la secuencia codificante de *RIM8* en la cepa Y00000 (Euroscarf, silvestre) con el marcador URA3 como producto de PCR obtenido con el plásmido

Materiales y métodos

pBS-8b (derivado de pNKY51 [1]) y los oligonucleótidos OV558-OV559. Los transformantes se seleccionaron por crecimiento en un medio sin uracilo. Posteriormente, esta cepa se transformó con el producto de la digestión de un plásmido derivado de pRim8-HA (ver sección “plásmidos”) en el que el epítipo triple HA se sustituyó por digestión con Not1 por una triple repetición de GFP. Esta triple repetición de GFP se obtuvo como producto de PCR del plásmido p123NLS-3XGFP y los oligonucleótidos OV601-OV602. Los transformantes se seleccionaron por crecimiento en un medio que contenía 0,02 gr de FoA (US Biological) y todos los aminoácidos complementarios.

- La cepa OVY137 que expresa las proteínas Rim8-mCherry, Rim21-GFP, Dfg16 y Rim9 bajo el control del promotor y terminador de *ADH1*, se generó por integración sucesiva de estas construcciones en los locus *URA3*, *HIS3*, *LEU2* y *TRP1* de la cepa W303-1A. Para ello, esta se transformó de forma sucesiva con los productos de digestión siguientes: p447/EcoR5 (derivado de pRS304 [175] que contiene la secuencia codificante de *RIM9* bajo el control del promotor y terminador de *ADH1*), p534/Nhe1 (derivado de pRS303 que contiene la secuencia codificante de *RIM8* fusionada a mCherry bajo el control del promotor y terminador de *ADH1*), p542/Cla1 (derivado de pRS305 que contiene la secuencia codificante de *RIM21* fusionada a GFP bajo el control del promotor y terminador de *ADH1*), y p449/Cla1 (derivado de pRS306 que contiene la secuencia codificante de *DFG16* bajo el control del promotor y terminador de *ADH1*). En cada ronda de transformación, los transformantes con la integración correspondiente fueron seleccionados por crecimiento en un medio que carecía de los aminoácidos correspondientes al locus de integración (*URA3*, *HIS3*, *LEU2* y *TRP1*).

En todas las cepas construidas, los reemplazamientos génicos e integraciones se comprobaron mediante PCR. Las cepas obtenidas de Euroscarf están descritas en: <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf>.

Cepas de *Escherichia coli*

La cepa de *E. coli* DH5 α [*F'* endA1 hsdR17 supE44 thi1 recA1 gyrA relA1 Δ (lacIZYA-argF)] del tipo K-12 se ha utilizado como cepa de alta frecuencia de transformación [14]. Para la expresión de proteínas heterólogas, hemos utilizado la cepa BL21 (*F*- *ompT* *hsdSB*(rB-, mB-) *gal dcm*) que carece de la actividad proteolítica de 2 proteasas (ión proteasa y proteasa de membrana externa), por lo que se reduce la degradación de las proteínas heterólogas.

VECTORES

pCR2.1-TOPO : Plásmido comercial de la casa Invitrogen, incluido en el kit de clonación “TOPO TA Cloning Kit”. Se utilizó para clonar fragmentos de PCR mediante el sistema “TOPO Cloning” de clonación de productos de PCR con topoisomerasas.

Plásmidos para la expresión de proteínas en bacteria

Expresión de fusiones a GST

- **pGEX-5X-1**: Plásmido comercial de la casa GE Healthcare. Permite generar fusiones de la proteína glutatión S-Transferasa (GST) a la parte N-terminal de cualquier proteína. Se utilizó para la expresión en *E. coli* de fusiones a la proteína GST.

- **pGST-Vps23**: La secuencia codificante de *VPS23* se obtuvo por PCR de DNA genómico de levadura con los oligonucleótidos OV291-OV292. El fragmento obtenido se clonó en pCR2.1-TOPO. El vector generado se digirió con EcoR1 y el inserto liberado se clonó en pGEX-5X-1 digerido con EcoR1.
- **pGST-Rsp5WW**: El fragmento genómico correspondiente a los codones 228-430 de Rsp5 (dominios WW) se obtuvo por PCR de DNA genómico de levadura con los oligonucleótidos OV273-OV274. El fragmento obtenido se clonó en pCR2.1-TOPO. El vector generado se digirió con Bgl2 y el inserto liberado se clonó en pGEX-5X-1 digerido con BamH1.
- **pGST-Vps23UEV**: Este plásmido se obtuvo por PCR mutagénica del plásmido pGST-Vps23 con los oligonucleótidos OV384-OV385. Esta mutagenesis sustituye el codón 162 por un codón de parada.
- **pGEX-6p-1**: Plásmido comercial de la casa GE Healthcare. Permite generar fusiones de la proteína GST a la parte N-terminal de cualquier proteína. Además, incluye una secuencia de reconocimiento y corte por la proteasa PreScission (GE Healthcare) que permite eliminar la GST tras obtener la fusión. Se utilizó para la expresión en *E. coli* de fusiones a la proteína GST que se usarían en los ensayos de ubiquitilación *in vitro*.
- **pGST-RRASV-Rim8**: Con el oligonucleótido de doble cadena generado por el par OV770-OV771 se introdujo un sitio de reconocimiento por la kinasa dependiente de AMPc (RRASV) en el sitio BamH1 del plásmido pGEX-6p-1. Seguidamente, se amplificó la secuencia codificante de *RIM8* con los oligonucleótidos OV317-OV318 y se introdujo en el vector pCR2.1-TOPO. Este se digirió con BamH1 y se introdujo el inserto liberado en el plásmido generado previamente digerido con BamH1.
- **pGST-RRASV-Rim8CT**: La región codificante C-terminal de *RIM8* (codones 461-542) se amplificó con los oligonucleótidos OV617-OV618, que además incluyen la secuencia RRASV de reconocimiento por la kinasa dependiente de AMPc. El fragmento obtenido se introdujo en el vector pCR2.1-TOPO que se digirió con Bgl2. El inserto liberado se introdujo en el plásmido pGEX-6p-1 digerido con BamH1.

Los oligonucleótidos que se utilizaron para introducir las distintas mutaciones en los plásmidos derivados de pGST-RRASV-Rim8CT son los siguientes:

- K507R: OV619-OV620
- K513R: OV293-OV294
- K521R: OV253-OV254
- K527R: Ov295-OV296
- V505A P506A K507A Y508A(Δ PKY): OV660-OV661
- E533Aa S534A D535A P536A (Δ ESDP): OV513-OV514

Expresión de fusiones a una secuencia HexaHistidina

- **pHis6-Ubc4**: Este plásmido se utilizó para la expresión de la enzima E2 Ubc4 para ensayos de ubiquitilación *in vitro* [96].
- **pHis6-Rsp5**: La secuencia codificante de *RSP5* se obtuvo por PCR de DNA genómico de levadura con los oligonucleótidos OV210-OV211. El fragmento obtenido se clonó en pCR2.1-TOPO. El vector generado se digirió con EcoR1 y el inserto liberado se clonó en un derivado del vector pET19b (Novagen) digerido con EcoR1.

Materiales y métodos

- **pHis6-Mms2**: La secuencia codificante de *MMS2* se obtuvo por PCR de DNA genómico de levadura con los oligonucleótidos OV693-OV694. El fragmento obtenido se clonó en pCR2.1-TOPO. El vector generado se digirió con BamH1 y el inserto liberado se clonó en un derivado del vector pET19b digerido con BamH1.
- **pHis6-Vps23UEV**: La secuencia codificante correspondiente al dominio UEV de Vps23 (codones 1-161) se obtuvo por PCR de DNA genómico de levadura con los oligonucleótidos OV291-OV385. El fragmento obtenido se clonó en pCR2.1-TOPO. El vector generado se digirió con EcoR1 y el inserto liberado se clonó en un derivado del vector pET19b digerido con EcoR1.
- **pHis6-Vps23UEV(Δ SDG)**: Este plásmido se obtuvo por PCR mutagénica del plásmido pHis6-Vps23UEV con los oligonucleótidos OV419-OV420. Estos oligonucleótidos introducen las sustituciones S55A D56A G57A.

Plásmidos utilizados para la expresión de proteínas *in vitro*.

- **pGBKT7** : Plásmido comercial de la casa Clontech. Se utilizó para la expresión *in vitro* de proteínas en el sistema TNT a partir del promotor T7.
- **pGBKT7-Rim8**: La secuencia codificante de *RIM8* se obtuvo por PCR de DNA genómico de levadura con los oligonucleótidos OV317-OV318. El fragmento obtenido se clonó en pCR2.1-TOPO. El vector generado se digirió con BamH1 y el inserto obtenido se clonó en pGBKT7 digerido con BamH1.
- **pGBKT7-Rim8(461-542)**: La secuencia codificante de *RIM8* correspondiente a los codones 461-542 se obtuvo por PCR de DNA plasmídico con los oligonucleótidos OV275-OV276. El fragmento obtenido se clonó en pCR2.1-TOPO. El vector generado se digirió con BamH1 y el inserto obtenido se clonó en pGBKT7 digerido con BamH1.

Plásmidos para la expresión de proteínas en *Saccharomyces cerevisiae*.

Expresión de fusiones al dominio de activación de Gal4 (GAD).

- **pACT2**: Plásmido comercial de la casa Clontech. Se utilizó para expresar fusiones de proteínas al dominio de activación de Gal4 (GAD) y analizar interacciones en el sistema de doble-híbrido.
- **pGAD-Vps23**: La secuencia codificante de *VPS23* se obtuvo por PCR de DNA genómico de levadura con los oligonucleótidos OV291-OV292. El producto obtenido se clonó en pCR2.1-TOPO. El vector generado se digirió con Nco1 y el fragmento liberado se clonó en pACT2 digerido con Nco1.
- **pGAD-Vps23(S56A)(D57A)(G58A)**: Este plásmido se obtuvo por PCR mutagénica del plásmido pGAD-Vps23 con los oligonucleótidos OV419-OV420.
- **pGAD-Vps23UEV**: Este plásmido se obtuvo por PCR mutagénica del plásmido pGAD-Vps23 con los oligonucleótidos OV384-OV385. Esta mutagenesis sustituye el codón 162 por un codón de parada.
- **pGAD-Rim21Cterm**: El fragmento genómico correspondiente a los codones 327-534 de Rim21 se obtuvo por PCR de DNA genómico de levadura con los oligonucleótidos OV182-OV183. El producto obtenido se clonó en pCR2.1-TOPO. El vector generado se digirió con BamH1 y el fragmento liberado se clonó en pACT2 digerido con BamH1.

Expresión de fusiones al dominio de unión a ADN LexA.

- **pLex202+PL**: Plásmido utilizado para expresar fusiones de proteínas al dominio de unión a ADN de LexA [157]

- **pLex202-Rim8:** La secuencia codificante de RIM8 se obtuvo por PCR de DNA genómico de levadura con los oligonucleótidos OV317-OV318. El producto obtenido se clonó en pCR2.1-TOPO. El vector generado se digirió con BamH1 y el inserto liberado se clonó en pLex202+PL digerido con BamH1.

- **pLex202-Rim8(528-542):** El oligonucleótido de doble cadena formado por el par OV344-345 se introdujo en el vector pLex202+PL que previamente se había digerido con BamH1.

Plásmidos para la expresión de proteínas etiquetadas con epítomos en levadura.

- **pWS93:** Plásmido que permite la expresión de proteínas de fusión al un triple epítipo HA desde el promotor de *ADH1* [178].

- **pADH1-HA-Vps23UEV:** El fragmento genómico correspondiente a los codones 1-161 de Vps23 se obtuvo por PCR de DNA genómico de levadura con los oligonucleótidos OV291-OV385. El fragmento obtenido se clonó en pCR2.1-TOPO. El vector generado se digirió con EcoR1 y el fragmento obtenido se clonó en pWS93 digerido con EcoR1.

- **pADH1-HA-Vps23UEV(S56A)(D57A)(G58A):** Este plásmido se obtuvo por PCR mutagénica del plásmido pADH1-HA-Vps23UEV con los oligonucleótidos OV419-OV420.

- **pRS313 y pRS316:** Plásmidos centroméricos que permiten la expresión de proteínas en levadura [175].

- **pRS423 y pRS424:** Plásmidos de alto número de copias que permiten la sobreexpresión de proteínas en levadura [175].

- **pVps23-Flag:** Un fragmento genómico con el gen *VPS23*, que contiene su promotor (0.5kb) y su terminador (0.3kb), se obtuvo mediante PCR con los oligonucleótidos OV417-OV418. Se clonó en pCR2.1-TOPO. Este fragmento de DNA se aisló con los enzimas Sac1 y Spe1 y se clonó en un plásmido derivado de pRS316 [175] en el cual el sitio NotI había sido eliminado mediante una digestión con NotI y tratamiento con klenow. Posteriormente, se introdujo por PCR mutagénica una diana de restricción para NotI en el extremo C-terminal. Seguidamente, en el plásmido generado y digerido con NotI, se introdujo el oligonucleótido de doble cadena OV160-OV161 que codifica para el triple epítipo Flag.

- **pVps23-mCherry:** Se siguió el mismo procedimiento que para pVps23-Flag, pero en el sitio NotI, se introdujo el fragmento correspondiente a mCherry obtenido mediante PCR con el plásmido pmCherry y los oligonucleótidos OV487-OV488.

- **pHA-Rim8:** Un fragmento genómico con el gen *RIM8*, que contiene su promotor (1kb) y su terminador (0.5kb), se obtuvo mediante PCR con los oligonucleótidos OV180-OV181. Se clonó en pCR2.1-TOPO. Este fragmento de DNA se aisló con los enzimas BamHI y ClaI y se clonó en un plásmido derivado de pRS313 [175] en el cual el sitio NotI había sido eliminado mediante una digestión con NotI y tratamiento con klenow. Mediante mutagénesis dirigida con los oligonucleótidos OV265-OV266, se creó un sitio NotI después del codón 185 en *RIM8*, utilizado para introducir una secuencia que codifica para el triple epítipo HA, extraída como fragmento NotI/NotI desde el plásmido pGTEP1 [192].

- **pFlag-Rim8:** Se siguió el mismo procedimiento que para pHA-Rim8, pero en el sitio NotI se introdujo el oligonucleótido de doble cadena generado por el par OV160-OV161.

Materiales y métodos

- **pRim8-HA:** Se siguió el mismo procedimiento que para pHA-Rim8 pero el sitio Not1 se introdujo inmediatamente antes del codón de parada, mediante mutagénesis dirigida con los oligonucleótidos OV413-OV414.
- **pRim8-GFP:** El fragmento Sac2/Cla1 del plásmido pRim8-HA fue clonado en el plásmido de alto número de copias pRS423. Seguidamente, el fragmento HA se sustituyó mediante corte por Not1, por el fragmento Not1 del plásmido pSFGP1 [87].
- **pHA-Rim8(U):** Se obtuvo clonando el fragmento liberado por la digestión del plásmido pHA-Rim8 con las enzimas Cla1 y Sac2 en el vector pRS316.
- **pRim8-HA(U):** Se obtuvo clonando el fragmento liberado por la digestión del plásmido pRim8-HA con las enzimas Cla1 y Sac2 en el vector pRS316.
- **pFlag-Rim8(1-504)-Vps23:** Se introdujo una diana de restricción para Nco1 inmediatamente después del codón 504 de Rim8 en el plásmido pFlag-Rim8 usando los oligonucleótidos OV308-OV309. Estos oligonucleótidos, además, insertan un codón de parada tras la diana de Nco1. Por otro lado, se amplificó por PCR la secuencia codificante de Vps23 con los oligonucleótidos OV312-OV292 que introducen secuencias para Nco1 flanqueantes. Este producto se introdujo en el vector pCR2.1-TOPO, que posteriormente se digirió con Nco1. El fragmento liberado se introdujo en el vector generado previamente por clonaje por corte con Nco1.

Los oligonucleótidos que generaron las distintas mutaciones en los plásmidos de expresión de Rim8 en levadura son los siguientes:

- P506A: OV257-OV258
- K521K: OV253-OV254
- K527K: OV295-OV296
- P536A: OV313-OV314
- V505Stop: OV308-OV309
- E533Aa S534A D535A P536A (Δ ESDP): OV513-OV514

Plásmidos de expresión de ubiquitina bajo el control del promotor *CUP1*.

- **Yep96:** Este plásmido permite la expresión de ubiquitina desde el promotor *CUP1* inducible por cobre [78].
- **Yep112:** este plásmido permite la expresión de ubiquitina etiquetada con el epítipo HA desde el promotor *CUP1* inducible por cobre [78].
- **pCUP1-UbOk:** Se construyó reemplazando el fragmento BamH1-Kpn1 del plásmido Yep96 por el correspondiente fragmento del plásmido LHP306 que contiene ubiquitina sin residuos de lisina [188].

Construcción para el análisis de la actividad de un promotor controlado por Rim101.

pLGn+3xNRE22D: Este plásmido permite la expresión del gen *lacZ* bajo el control de un promotor regulado por Rim101 (*CYC1-NRE-lacZ*) [155].

Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados se describen en la **tabla 2**

Tabla 2. Oligonucleotidos

	SECUENCIA 5'-3'
OV160	GGCCCAATGGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAG
OV161	GGCCCTTGTTCATCGTCATCCTTGTAAATCGATGTCATGATCTTTATAATCACCGTCATGGTCTTTGTAGTCCTTTG
OV180	GGGGGATCCACATGTCGTTACTGAGACTGTGG
OV181	GGGGGATCCTTAATAGTCATCACAAGGGGGAG
OV182	GGGGGATCCTCACATGGGAGTGGCTGGATAG
OV183	GGGGGATCCTCAAATATGGCCTATATGGTCGC
OV210	GAGATCTCAATGCCTTCATCCATATCCGTC
OV211	GAGATCTCATTCTTGACCAAACCCTATGG
OV253	GTACCGTCGGAAGACAGACAAGAACTTGAAC
OV254	GTTCAAGTTCTTGTCTGTCTTCCGACGCTAG
OV257	GACGATGTTCCAGTTGCAAAGTATTCGCCAAATG
OV258	CATTTGGCGAATACTTTGCAACTGGAACATCGTC
OV265	GAATCCCTCAACAACATCAGCGGCCGCAAAAAACCGGAAGCAAG
OV266	CTTGCTTCCGGTTTTTTGCGGCCGCTGATGTTGTTGAGGGATTG
OV273	GAGATCTTGTATGGTCGTTTACCCCTGG
OV274	GAGATCTATTGTGGAACATTTTGGTCTAGC
OV275	GGGATCCCGACGAGATCCGAACAGCAGC
OV276	GGGATCCTTAATAGTCATCACAAGGGGGAG
OV291	CCCATGGCGATGTCTGCAAACGGCAAGATC
OV292	CCCATGGTCACGATAACGGTGAGGTGATTG
OV293	GTATTGCCAAATGATAGAGTCAGTGTACCGTCG
OV294	CGACGGTACACTGACTCTATCATTTGGCGAATAC
OV295	CAAGAACTTGAACAAAGAAGACTACAACAGCAAC
OV296	CTAACTGTTGTAGTCTTCTTTGTTCAAGTTCTTG
OV308	GATAGTGACGATGTTCCATGGTGAAAGTATTCGCCAAATGATAAAGTC
OV309	GACTTTATCATTTGGCGAATACTTTACCATGGAACATCGTCACTATC
OV312	CCCATGGATGTCTGCAAACGGCAAGATC
OV313	CAGTTAGAAAGCGATCTTCCCCCTTGTGATGAC
OV314	GTCATCACAAGGGGGAAGATCGCTTTCTAACTG
OV317	GGGATCCACATGTCGTTACTGAGACTGTGGAAC
OV318	GGGATCCTGCACTTTTAAATAGTCATCACAAG
OV344	GATCAGACTACAACAGTTAGAAAGCGATCCTCCCCCTTGTGATGACTATT
OV345	GATCAATAGTCATCACAAGGGGGGAGGATCGCTTTCTAACTGTTGTAGTCT
OV384	GCCACAAGATCAGGCGCCCTGACTACCCCTAAGCCCAATAC
OV385	GTATTGGGCTTAGGGGGTAGTCAGGGCGCCTGATCTTGTGGC
OV413	GATGACTATTGCGGCCGCTAGGTAACAAGTCATATACTC
OV414	GAGTATATGACTTGTTACCTAGCGGCCGCAATAGTCATC
OV417	TTCTAGACACCAAGGGATGGAGCTGGC
OV418	CCTGCAGTCTAGTGTGGGCAAGGGAGG
OV419	GAACAAGGGTATTTACGCACGCTGCCGCCACTCCACAACACTACTGTTGTC
OV420	GACAACAGTAGTTGTGGAGTGGCGGCAGCGTGCCTAAATACCCTTGTTG
OV487	GGCGGCCGCATGGTCAGCAAGGGCGAGGAG
OV488	GGCGGCCGCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC
OV493	TTCTGTTTGATCTAGAACTAGCCTATAAAAGTTTTTATGCTTTACTGGATCGGATCCCCGGGTTAATTAA
OV494	AAACGCTTGTGTACTTATATATGTTATCATAATTTCTATTTGTTTATTTGCAATTCTGAGCTCGTTTAAAC
OV513	GACTACAACAGTTAGCAGCCGCTGCTCCCCCTTGTGATGAC
OV514	GTCATCACAAGGGGGAGCAGCGGCTGCTAACTGTTGTAGTC

Materiales y métodos

OV558 TAGTATAGTATCATCAGCATCACCCCTCACTATCGGTAGCATTGACCAAACGG
ATCCGATTGCGTAATCTCCGAGCAG
OV559 AGTTCCAACACGGCGCAAGCTGCGAGTATGACTTGTTACCTGCACTTTGGA
TCCATTACGACCGAGATTCCCGG
OV601 GAAGAGAAAGGTGCAATTGCGCGGCCGAGCAAGGGCGAGG
OV602 GGGCGGCCGCGCGCGGCCGCTTTACTTGTACAGC
OV617 GAGATCTAGGAGAGCTAGCGTTACGAGATCCGAACAGCAGCAATC
OV618 GAGATCTAGCGGCCGCACTGAGCAGCGTAATC
OV619 GTGACGATGTTCCAGTTCCAAGGTATTCGCCAAATGATAAAGTCAG
OV620 CTGACTTTATCATTTGGCGAATACCTTGGAACGGAACATCGTCAC
OV660 GCATATGATAGTGACGATGTTCCAGCTGCAGCGGCTTCGCCAAATGATAAAGTCAGTG
OV661 CACTGACTTTATCATTTGGCGAAGCCGCTGCAGCTGGAACATCGTCACTATCATATGC
OV693 GGGATCCATGTCAAAAGTACCAAGAAATTTTAGG
OV694 GGGATCCTAAAAGGTTTCTCCTTCCTTCGG
OV770 GATCTAGGAGAGCTAGCGTTGGGATCC
OV771 GATCGGATCCCAACGCTAGCTCTCCTA

Técnicas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Transformación de *S. cerevisiae*.

La cepa de levadura correspondiente se inoculó el día anterior en medio completo (YPAD) y se cultivó a 30°C hasta que alcanzó la fase estacionaria. Al día siguiente se midió la D.O. y el cultivo saturado se diluyó de tal forma que tardara 4 horas en alcanzar la fase logarítmica. Cuando la alcanzó, se centrifugó a 2000 r.p.m. durante 5 minutos en una centrífuga Rotofix32 y se descartó el sobrenadante. Se lavó la fracción celular con agua estéril, se pasó a tubos eppendorf y se volvió a centrifugar durante 5 minutos a 2000 r.p.m. en una centrífuga eppendorf 5415D, para finalmente resuspenderla en TeLiAc (TE, LiAc 0,1 M; 100 µl de TeLiAc por cada 5 ml de cultivo). Se prepararon tubos eppendorf con 20 µg de DNA "carrier" (DNA de esperma de salmón de la casa Sigma desnaturalizado tras hervirlo a 100°C durante 15 minutos) y 100 ng del plásmido apropiado para cada transformación. Se añadieron 50 µl de suspensión de levadura a cada tubo. A continuación, se añadieron 250 µl de TeLiPEG [TE, LiAc 0,1 M y 40% PEG3350 (Sigma)] y cada tubo se agitó con vortex durante 15 segundos. Los tubos se incubaron 30 minutos a 30 °C y se sometieron a un choque térmico durante 15 minutos a 42 °C. Finalmente, se centrifugaron 1 minuto a 13000 r.p.m, y se descartó el sobrenadante por aspiración. La levadura se resuspendió en 50 µl de agua y se sembró en placas de medio mínimo SD complementadas con los aminoácidos necesarios, sin incluir el correspondiente al marcador de selección del plásmido transformado. Las células transformadas se cultivaron a 30°C durante 3 o 4 días.

Extracción de DNA genómico de *S. cerevisiae*.

Para extraer el DNA genómico, se cultivó la levadura hasta fase estacionaria a 30 °C en medio mínimo SD. Se centrifugaron en tubos eppendorf 1,5 ml del cultivo durante 1 minuto a 13000 r.p.m, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 200 µl de tampón de extracción [2% Tritón X100 (Roche), 1% SDS, NaCl 100 mM, Tris HCl 10 mM pH8, EDTA 1 mM pH8], 0,3 g de bolas de vidrio 0,45 mm y 200 µl de fenol Sevag. Se agitó con vortex durante 2 minutos y se centrifugó durante 5 minutos a 13000 r.p.m. La fracción limpia de la fase superior acuosa se recogió. Se utilizó 1 µl de ella como molde en las reacciones de PCR.

Extracción de proteínas totales de *S. cerevisiae*.

Para extraer las proteínas totales de levadura, se realizó un cultivo en medio mínimo SD (pH inicial 4,5 / pH final 3,5) al que se dejó alcanzar la fase logarítmica de crecimiento. En los casos indicados, el pH del cultivo se incrementó hasta pH 7 con 10 mM KOH 30 minutos antes de recoger las células para activar la ruta *RIM*.

Método 1 (extracción con bolas de vidrio).

Se utilizó este método para obtener extractos para ensayos de inmunoprecipitación, unión *in vitro* con extractos celulares y para la medición de actividad β -galactosidasa. Se centrifugaron 15 ml de cultivo en fase logarítmica a 2000 r.p.m. durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. La levadura fue resuspendida en 400 μ l de tampón IP [50 mM HEPES, pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.1% Triton X-100; 1 mM DTT; 10% glicerol; 5 mM N-etilmaleimida; cocktail de inhibidores de proteasas (Complete) en la cantidad recomendada por el fabricante (Roche)] y transferida a un tubo de vidrio (Kimax) con 1 g de bolas de vidrio 0,45 mm. Se agitó con vortex 10 veces durante 10 segundos. Entre cada ronda de agitación se mantuvo 10 segundos en hielo. Se recogió el lisado y se pasó a un tubo eppendorf que se centrifugó a 13000 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C. Se recogieron 150 μ l de sobrenadante limpio. La concentración de proteína se valoró con el método de Bradford.

Método 2 (hervido rápido).

Este método se utilizó para extraer Rim101-HA y Flag-Rim8 tal y como se muestran en la Figura R-8. Se centrifugó 1 ml de cultivo en fase logarítmica a 13000 r.p.m. durante 1 minuto y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió la levadura en 50 μ l de tampón de carga SB (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 10% Glicerol; 2% β -mercaptoetanol; 0,025% azul de bromofenol). Se añadieron 0,1 g de bolas de vidrio 0,45 mm y se hirvió inmediatamente durante 3 minutos. Se agitó con el vortex durante 30 segundos, se hirvió de nuevo durante 3 minutos y se agitó con el vortex 30 segundos más. Finalmente, se centrifugó el tubo 1 minuto a 13000 r.p.m. y se utilizaron 10 μ l del sobrenadante para ensayos de inmunoblot.

Método 3 (lisis alcalina).

Se utilizó este método para extraer Rim8 y Vps23 etiquetados con el epítipo HA. Se centrifugó 1 ml de cultivo en fase logarítmica a 13000 r.p.m. durante 1 minuto y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió la levadura en 500 μ l de una solución con 0,2 M de NaOH y 2 μ l/ml de β -mercaptoetanol. Se mantuvo durante 10 minutos en hielo y se añadieron 25 μ l de ácido tricloro acético. Se mantuvo 10 minutos más en hielo. Posteriormente se centrifugó 1 minuto a 13.000 r.p.m. y se eliminó el sobrenadante. La fracción sólida se resuspendió en una solución que contenía 35 μ l de tampón de carga SB y 15 μ l de TrisHCl pH8. En los ensayos de inmunoblot se utilizaron 10 μ l de este extracto.

Técnicas generales de bioquímica y biología molecular.**Inmunoprecipitación con resina acoplada a anticuerpo α -HA o α -Flag.**

Para inmunoprecipitar proteínas etiquetadas con un triple epítipo HA o Flag, se utilizaron 20 μ l de las resinas con anticuerpos α -HA o α -Flag acoplado covalentemente (α -HA Roche ref. 11815016001 α -Flag Sigma ref. A2220). En primer lugar, la resina se lavó 3 veces con 1 ml del tampón IP (solo para el caso de la resina α -HA). Después, se añadieron 400 μ l de tampón IP a 100 μ l de extracto de proteínas totales (400 μ g de proteína

total) y se incubaron con la resina en una rueda giratoria durante 1 hora a 4 °C. Posteriormente, la resina se lavó 3 veces con 1 ml de tampón IP durante 10 minutos girando en la rueda cada vez. En el último lavado, se eliminó completamente el sobrenadante y se añadieron 20 µl de tampón de carga SB. Para los “input”, se mezclaron 8 µl de extracto con 2 µl de tampón de carga SB.

Ensayos de inmunodetección de proteínas.

Las muestras preparadas en tampón de carga SB se desnaturalizaron hirviéndolas durante 5 minutos. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes según el protocolo de Laemmli [97]. El protocolo de inmunoblot se describe en [133]. Las proteínas se revelaron con los anticuerpos primario y secundario correspondientes conjugados a la peroxidasa. Los anticuerpos y diluciones fueron: 1/1000 para α -HA (3F10, rata. Roche), 1/10000 para α -Flag (M2, ratón. Sigma) y α -ratón (oveja α -ratón, acoplado a peroxidasa. Amersham Biosciences) y 1/4000 para α -rata (anticuerpo de cabra α -rata, acoplado a peroxidasa. Southern Biotech). La actividad de la peroxidasa se detectó utilizando el sistema de quimioluminiscencia ECL plus (Amersham Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante, y exponiendo las membranas a películas Kodak X-OMAT.

Purificación de proteínas expresadas en bacterias.

Para generar las fusiones de proteínas a GST usadas en los ensayos de unión *in vitro*, se utilizó la cepa BL21 de *E. coli*, transformada con el plásmido de expresión. Las bacterias se cultivaron en 5 ml de medio LB con 100 µg/ml de ampicilina, a 37°C durante 16 horas. Una dilución 1/50 en LB con ampicilina del precultivo (volumen final 50 ml) se incubó con agitación a 37 °C hasta que alcanzó la fase logarítmica de crecimiento. En ese momento, se añadió IPTG (concentración final 0,1 mM) y se incubó 2 horas con agitación a 30°C. Después, se recogieron los cultivos por centrifugación a 4.000 r.p.m. durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. Las bacterias sedimentadas se resuspendieron en 7 ml de tampón STE [Tris-HCl 10 mM pH8, EDTA 1 mM pH8, NaCl 150 mM, DTT 1 mM y un cocktail de inhibidores de proteasas (Complete) en la cantidad recomendada por el fabricante (Roche)]. Seguidamente, se añadió Triton X100 a una concentración final de 1% (tampón STE+T), y las células se lisaron en una French Press. Los lisados se alicuotaron y se repartieron en tubos eppendorf que se centrifugaron a 13.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante. 1 ml del sobrenadante se incubó con 100 µl de resina de glutatión-sefarosa (Amersham Biosciences) durante 1 hora en una rueda giratoria a 4°C. Antes de utilizarla, la resina se lavó 5 veces con tampón STE+T. Tras la incubación con el extracto, la resina se lavó 5 veces con 1 ml de tampón STE+T para eliminar las proteínas unidas de manera inespecífica.

Para las proteínas de fusión a GST utilizadas como sustrato de ubiquitilación *in vitro*, se utilizó el mismo protocolo hasta llegar al paso de lisis por French Press. En este caso, se resuspendieron las bacterias sedimentadas en 5 ml del mismo tampón, se añadió el Tritón X100 a la concentración final de 1% y se lisó por sonicación en 3 ciclos compuestos por 10 segundos a la máxima intensidad, seguidos de 20 segundos en hielo. Se usó el sonicador SoniPrep 150. Después de la lisis, el protocolo siguió con la incubación con resina de glutatión-sefarosa, pero en este caso solo se usaron 5 µl del lisado y 50 µl de resina (en 500 µl de volumen

final). En el caso en que la fusión correspondía a la proteína Rim8 entera, se usaron 500 µl del sobrenadante. Después de los lavados, la resina se lavó dos veces más con tampón PKA (40 mM Tris HCl pH 7.5, 20 mM MgCl₂) y se resuspendió en 500 µl de este mismo tampón. Estas suspensiones se conservaron congeladas a -80 °C hasta que se usaron para marcarlas con [γ -³²P]ATP y como sustrato de ubiquitilación *in vitro*.

Para la purificación de proteínas fusionadas a hexahistidina, usadas en ensayos de ubiquitilación *in vitro* (Ubc4, Rsp5, Vps23UEV y Mms2), se utilizaron las mismas condiciones de cultivo e inducción que para fusiones a GST. Las bacterias, una vez sedimentadas se resuspendieron en 7 ml de tampón Ni300 [50mM NaP, 300 mM NaCl con un cocktail de inhibidores de proteasas (Complete EDTA free, Roche)]. Luego se añadió Triton X100 para que quedara a una concentración final de 0.5%. Las células se lisaron con una French Press y 1 ml del sobrenadante se utilizó para la purificación de la proteína etiquetada. Para purificar las fusiones a hexahistidina, se utilizaron 150 µl de resina de afinidad por cobalto Talon (Clontech) previamente lavada 3 veces con 1 ml de tampón Ni300 con Tritón X100 a una concentración final de 0.5%. 1 ml de los extractos se incubó con la resina durante 1h a 4°C y posteriormente se centrifugó y eliminó el sobrenadante. Se volvió a añadir 1ml del tampón y se realizaron 3 rondas de lavado de 10 minutos en la rueda giratoria a 4 °C. Después se hizo un lavado adicional con el mismo tampón con 7.5 mM de imidazol y un último lavado con el tampón sin Triton X100 ni imidazol.

Para eluir las proteínas etiquetadas con hexahistidina, se eliminó el tampón por aspiración y se añadieron 375 µl de tampón Ni300 con 150 mM imidazol. Se dejó el tubo 10 min en una rueda giratoria a 4 °C, se centrifugó y se recogió el sobrenadante. Se repitió la elución 4 veces. Se cargaron pequeñas cantidades de cada elución en un gel de SDS-poliacrilamida para visualizar las fracciones más enriquecidas por tinción con Coomassie. Estas se juntaron y dializaron durante 16 horas a 4°C frente a un volumen 1000 veces superior de tampón de ubiquitilación (10 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl). La concentración de proteínas se determinó mediante tinción con Coomassie con una recta patrón de BSA. Posteriormente se alícuotó y congeló a -80°C. Para la fusión de UEV(S56A)(D57A)(G58A) se usó 1.5 M imidazol ya que no era posible eluirlo con concentraciones más bajas de imidazol.

La fusión de Rsp5 a hexahistidina se obtuvo de igual modo, pero con el tampón Ni50 (50mM NaP) y se eluyó en tampón de ubiquitilación con 150 mM imidazol. No se dializó. Estos cambios se introdujeron porque esta proteína precipita en presencia de bajas concentraciones de NaCl. Se congeló a -80 °C en presencia de 10% glicerol.

Ensayos de unión *in vitro*.

Para sintetizar *in vitro* y marcar las proteínas con metionina [³⁵S] (1,000 Ci/mmol) se utilizó el sistema TNT (Promega), según las instrucciones del fabricante. En cada reacción se utilizaron 7,5 µl de una solución de plásmido preparada con el kit QIAprep® Spin Midiprep Kit (Qiagen). Para cada incubación, se juntaron 20 µl de resina glutatión-sefarosa cargada con la proteína fusionada a GST con 5 µl del producto de expresión de TNT y se llevó hasta un volumen final de 500 µl con tampón STE+T (ver sección anterior). Las muestras se mantuvieron girando durante 1 hora a 4°C en una rueda. Las proteínas no unidas se eliminaron mediante 5 lavados con 1 ml de STE+T. Tras el último lavado, se aspiró completamente el sobrenadante y se resuspendió la

Materiales y métodos

resina en 20 μ l de tampón SB. Las proteínas se desnaturalizaron 5 minutos a 100°C y, tras una breve centrifugación, se cargaron 10 μ l del sobrenadante. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida. Las proteínas totales se visualizaron tiñendo el gel con Coomassie G250 (Biosafe Bio-Rad). Para revelar las proteínas marcadas con metionina [35 S], se secó el gel en un secageles (BioRad Gel Dryer 583) durante una hora a 80 °C y se expuso a una película sensible a la radiactividad Kodak X-OMAT, en presencia de una pantalla intensificadora (BioMax TranScreen-LE de Kodak).

Para los ensayos de unión *in vitro* con extractos proteicos de levadura se sustituyó el producto de la reacción de TNT por 60 μ l (240 μ g de proteína total) de extracto proteico generado por el método de extracción con bolas de vidrio. En este caso, las proteínas etiquetadas se detectaron mediante inmunoblot.

En el ensayo de unión *in vitro* con proteínas ubiquitiladas *in vitro*, el sobrenadante obtenido tras el corte con la proteasa PreScission (ver sección “ubiquitilación *in vitro*”) se usó como presa para la unión a la fusión GST-Vps23UEV. El volumen final fue el mismo y, antes del primer lavado, para poder analizarla, la fracción “no unida” se precipitó con TCA. Para revelar las proteínas marcadas con [γ - 32 P]ATP, se utilizó una pantalla intensificadora Hyperscreen RPN1662 de Amersham Biosciences.

Marcaje de sustratos para ubiquitilación *in vitro* por fosforilación con [γ - 32 P]ATP.

Se centrifugaron 25 μ l de las suspensiones que contenían las fusiones a GST y se eliminaron 11 μ l del sobrenadante. Se añadieron 0.5 μ l (5 μ Ci) de [γ - 32 P]ATP y 6.25 u de la proteína kinasa dependiente de AMPc PKA (Promega). Se incubó 40 min a temperatura ambiente. Se hizo un lavado con 500 μ l de tampón STE+T+ 500mM NaCl (consultar sección: “Purificación de proteínas expresadas en bacterias”) y dos lavados con 500 μ l de tampón de ubiquitilación (ver sección “ubiquitilación *in vitro*”). La resina se resuspendió en 500 μ l de tampón de ubiquitilación. Se utilizaron 10 μ l de esta suspensión en cada ensayo de ubiquitilación *in vitro*.

Ensayos de ubiquitilación *in vitro*.

Las fusiones a GST marcadas con [γ - 32 P]ATP y unidas a glutatión-sefarosa (10 μ l) se ubiquitaron *in vitro* a temperatura ambiente durante los tiempos indicados en cada caso. Cada reacción contenía además de la fusión: 15 μ l de tampón de ubiquitilación (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT), 50 μ g/ml de ubiquitina o, cuando se indica, ubiquitina sin residuos de lisina (K0) (ambas formas de la ubiquitina provienen de Boston Biochem), 4.5 μ g/ml de enzima E1 (Uba1, Boston Biochem), 6.25 μ g/ml de enzima E2 y 6.25 μ g/ml de enzima E3 (E2 y E3 han sido purificadas en el laboratorio, ver sección “plásmidos” y “purificación de proteínas fusionadas a hexahistidina”). Las reacciones fueron iniciadas por adición de 2,5 mM ATP. El volumen final fue de 40 μ l. Cuando se indica, la mezcla además contenía el dominio UEV de Vps23, su derivado mutante Vps23UEV(Δ SDG) o Mms2 purificados en el laboratorio (ver sección “plásmidos” y “purificación de proteínas fusionadas a hexahistidina”). Las reacciones se pararon pasado el tiempo indicado en cada caso añadiendo 500 μ l de tampón de la proteasa PreScission [50 mM tris-Hcl (pH 7), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT]. Después se centrifugaron las muestras, se eliminó el sobrenadante y se incubó la resina con 40 μ l de tampón PreScission en presencia de 0.5 μ l de proteasa PreScission durante 16 h at 4°C. Después, se centrifugaron las muestras y los sobrenadantes se analizaron por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida. Las proteínas

marcadas con [γ - ^{32}P]ATP se revelaron por autorradiografía (ver sección “ensayos de unión *in vitro*”). En el experimento de unión *in vitro*, con proteínas ubicuitiladas *in vitro*, se utilizó el doble de concentración de enzimas E1, E2 y E3. El sobrenadante obtenido tras el corte con la proteasa se usó como presa para la unión a la fusión GST-Vps23UEV.

Ensayos para medir la actividad β -galactosidasa.

Para los ensayos de doble híbrido, se realizó un cultivo en medio mínimo SD de las cepas transformadas con los plásmidos apropiados. Cuando alcanzó la fase logarítmica, se recogió 1 ml en un tubo Kimax. Se preparó uno blanco que no contenía células. Se centrifugaron 5 minutos a 2000 r.p.m. y se eliminó el sobrenadante.

Se añadieron a cada sedimento de levadura:

- 1 ml de tampón Z (60mM Na_2HPO_4 , 4mM NaH_2PO_4 , 10mM KCl, 1mM MgSO_4) con 2.7 $\mu\text{l/ml}$ de β -mercaptoetanol.
- 2 gotas de SDS al 0,1%
- 3 gotas de cloroformo

Los tubos se agitaron con vortex 10 segundos y se atemperaron 5 minutos en un baño con agua a 28°C. Posteriormente se añadieron 200 μl de una solución de 4 mg/ml de ONPG (sustrato de la β -galactosidasa, Sigma). Las mezclas de reacción se incubaron hasta detectar un cambio al color amarillo y se añadieron 500 μl de Na_2CO_3 1 M para parar la reacción. Se centrifugaron los tubos 5 min a 2000 r.p.m y se midió la absorbancia a 420 nm en placa Elisa. Se calcularon las unidades Miller [118].

$$U \text{ Miller} = \text{OD}_{420} \times 1000 \times 2 / \text{tiempo (min)}$$

Para cuantificar la actividad β -galactosidasa generada por el reportero *CYC1-NRE-lacZ*, se preparó un extracto proteico de las células transformadas. Este extracto se realizó como se describe en el método 1 (“extracción con bolas de vidrio”) pero el tampón usado fue el tampón Z. La mezcla de reacción se preparó con 100 μl de extracto y 900 μl de tampón Z. Se midió la concentración de proteína del extracto con el método de Bradford para normalizar el cálculo de la actividad β -galactosidasa.

“Kits” de biología molecular y bioquímica.

Los ensayos realizados con los “kits” que a continuación se detallan fueron llevados a cabo siguiendo las instrucciones de los fabricantes, con mínimas modificaciones.

- **QIAquick® Gel Extraction Kit** (Qiagen): Se utilizó para la purificación de fragmentos de DNA procedentes de electroforesis en geles de agarosa.
- **QIAprep® Spin Midiprep Kit** (Qiagen): Se utilizó para la purificación de plásmidos procedentes de *E. coli* con alto grado de pureza y concentración.
- **High Pure Plasmid Isolation Kit** (Roche): Se utilizó para la purificación rutinaria de plásmidos procedentes de *E. coli*.
- **TOPO TA Cloning® Versión P** (Invitrogen): Se utilizó para la clonación rápida de productos de PCR en el vector pCR2.1-TOPO mediante ligación por topoisomerasas.

Materiales y métodos

- **TNT Coupled Transcription-Translation System** (Promega): Se utilizó para la síntesis *in vitro* de proteínas y su marcaje con metionina [³⁵S] (1,000 Ci/mmol).
- **ECL™ plus Western Blotting Detection Reagents** (Amersham Biosciences): Se utilizó para la detección de anticuerpos conjugados a la peroxidasa de rábano en ensayos de inmunodetección de proteínas etiquetadas con epítomos.

Microscopia de fluorescencia

La cepa de levadura que sobreexpresa fusiones de Rim8 a GFP y de Vps23 a mCherry se cultivó hasta alcanzar la fase logarítmica en medio mínimo SD. 1 ml de cultivo fue centrifugado y resuspendido en 100 µl del mismo medio SD, se colocaron 2,5 µl de la suspensión en un porta para microscopia. La localización de las fusiones se monitorizó por fluorescencia directa antes de 5 minutos. Las células fueron observadas con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i. Las imágenes se capturaron con una cámara digital DS-Qi1Mc de Nikon usando el programa Nis elements BR 3.0 y se procesaron con el programa ImageJ.

La cepa de levadura que expresa Rim8-3XGFP y la que sobreexpresa Rim21-GFP, Rim8-mCherry, Dfg16 y Rim9 se cultivaron en medio completo YPAD hasta alcanzar la fase logarítmica (pH final 6). Los cultivos se centrifugaron y el sedimento celular se resuspendió en medio mínimo con 100 mM Hepes a pH4 o pH8. La captura de imágenes se realizó como se explica en el párrafo anterior.

RESULTADOS

Resultados

Bloque 1: Reclutamiento de la maquinaria ESCRT mediado por Rim8.

Un motivo SXP conservado y situado en el extremo C-terminal de Rim8 media en su interacción con la subunidad Vps23 de ESCRT-I.

La transmisión de la señal a través de la ruta *pal/RIM* requiere un complejo formado por una proteína de la familia de las arrestinas y una proteína de siete hélices transmembrana (7TM), además de la mayoría de los componentes de la maquinaria ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport). Sin embargo, Vps27, que media en el reclutamiento de ESCRT-I a las proteínas endocitadas, no parece tener función alguna en esta ruta. Por esta razón, probamos si la proteína relacionada con las arrestinas, Rim8, podría sustituir a Vps27 en el reclutamiento de ESCRT-I en el contexto específico de la ruta *RIM*. Para comprobar esta hipótesis, ensayamos su unión a la subunidad Vps23 de ESCRT-I, por ser la que interacciona directamente con ESCRT-0.

La primera aproximación a esta posible interacción, la realizamos mediante el sistema de doble híbrido. Para ello, construimos una fusión del dominio de unión a ADN de LexA a Rim8 que utilizamos como cebo. Como presa, utilizamos una fusión de Vps23 al dominio de activación de Gal4 (GAD). Estos ensayos demostraron que, efectivamente, Rim8 interacciona fuertemente con Vps23 (Figura R-1).

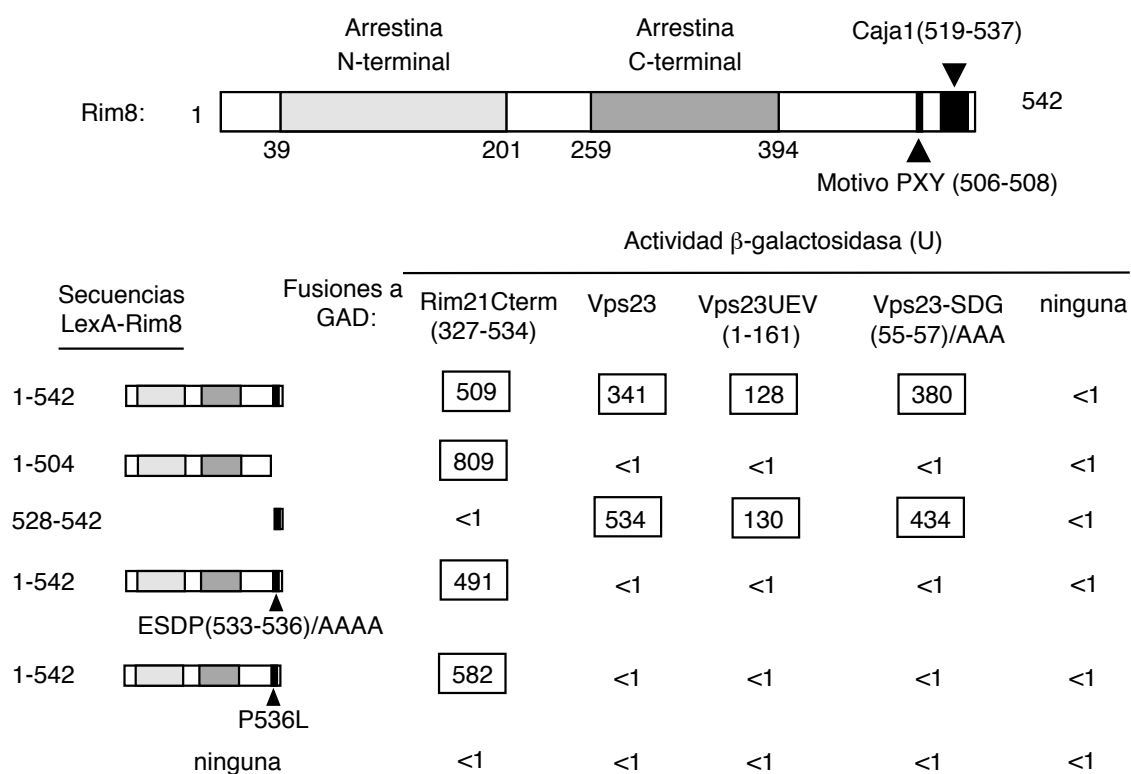


Figura R-1: **Interacción de Rim8 con Rim21 y Vps23.** Mapeo por doble híbrido de los dominios de interacción de Rim8. En la zona superior se muestran las posiciones de los dominios arrestina N- y C-terminal, la de un motivo PXY y la de la secuencia conservada denominada “caja 1”. A la izquierda se indican los residuos que delimitan las distintas fusiones de Rim8 a LexA. Se ensayó la interacción de estas fusiones con las proteínas quiméricas GAD-Rim21Cterm, GAD-Vps23 y las construcciones derivadas GAD-Vps23UEV y GAD-Vps23-SDG(55-57)AAA, o GAD solo. Se utilizó la cepa CTY10-5d. Los valores corresponden a la media de las actividades β-galactosidasa de cuatro transformantes. Ninguno de los errores estándar supera el 18%.

Resultados

En un trabajo anterior se había demostrado que el homólogo de Rim8 en *A. nidulans*, PalF, se une directamente a la cola citoplásmica de la proteína 7TM PalH [71]. Para comprobar si esta interacción está conservada en levadura, construimos una fusión de GAD a la cola C-terminal de Rim21 (GAD-Rim21Cterm), uno de los dos homólogos de PalH en *S. cerevisiae*. La unión descrita previamente entre las proteínas homólogas en *A. nidulans*, se reveló también en levadura como una fuerte interacción entre Rim8 y la cola citoplásmica de Rim21 (codones 327-534) (Figura R-1). Así, Rim8 interacciona tanto con la proteína 7TM Rim21 como con la subunidad de ESCRT-I Vps23.

Mediante la técnica de doble híbrido, no se puede afirmar de manera fehaciente que las interacciones observadas sean directas, ya que cabe la posibilidad de que terceras proteínas actúen de “puente” entre las proteínas de interés. Por ello, para comprobar si la interacción entre Rim8 y Vps23 es directa, iniciamos un abordaje de unión *in vitro* con proteínas purificadas. Por un lado, generamos una fusión de Vps23 a la glutatión S-transferasa (GST), que expresamos en bacterias y purificamos por afinidad con perlas de glutatión-Sefarosa. Por otro lado, sintetizamos mediante la técnica de transcripción y traducción *in vitro*, la proteína Rim8, que marcamos con metionina [³⁵S]. Mediante estos ensayos, hemos observado que Rim8 es retenido por la resina cuando esta está cargada con la fusión GST-Vps23, y no cuando esta cargada con GST solo. Así, estos datos indican que la interacción entre Rim8 y Vps23 es directa (Figura R-2).

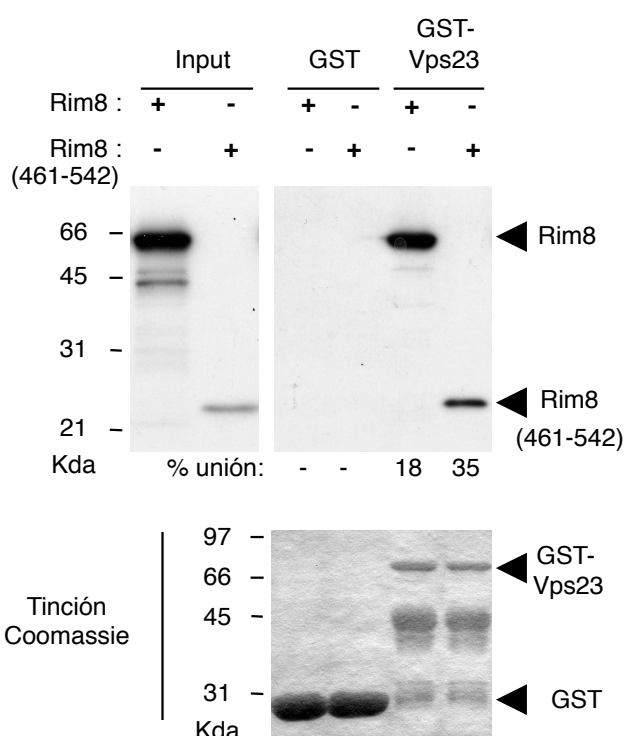


Figura R-2: **Unión *in vitro* de Rim8 a Vps23.** GST-Vps23 y GST fueron fijadas en perlas de glutatión-sefarosa. Posteriormente, estas fusiones fueron incubadas con Rim8 (entero o el fragmento indicado) sintetizado *in vitro* y marcado con metionina [³⁵S]. Tras el ensayo de interacción, las proteínas unidas fueron separadas en geles de SDS-poliacrilamida al 10% y detectadas mediante autoradiografía (panel superior) o por tinción de Coomassie (panel inferior). Los “input” representan las proteínas sintetizadas *in vitro* que se usaron para los experimentos de unión (20% de la cantidad incubada en el ensayo). Los porcentajes de unión indicados corresponden a la fracción del total de la proteína incubada que se unió a la fusión GST-Vps23.

Para seguir adentrándonos en los detalles moleculares de esta interacción, quisimos identificar las regiones de Rim8 que median en las interacciones observadas. La estructura de Rim8 se compone de una región N-terminal que abarca los dominios arrestina, seguidos de una cola C-terminal (Figura R-1). PalF, el homólogo de Rim8 en *A. nidulans* se une mediante los dominios arrestina a la proteína 7TM PalH, homóloga a Rim21 [71]. De acuerdo con la implicación de los dominios arrestina en la unión a la proteína 7TM, observamos que una fusión

de LexA a Rim8 truncado en su extremo C-terminal interacciona en el sistema de doble-híbrido con la fusión de GAD a la cola C-terminal de Rim21 (Figura R-1). Ya que la cola C-terminal de Rim8 no parecía necesaria para la interacción con Rim21, nos planteamos si su función pudiera estar relacionada con la interacción con Vps23. Para comprobarlo, sintetizamos *in vitro* esta región de Rim8 (codones 461-542) y realizamos un ensayo de unión *in vitro*, en el que observamos que por sí misma interacciona con Vps23 (Figura R-2). Por otro lado, la eliminación de una región aún menor de la parte C-terminal de Rim8 (codones 505-542) tuvo como consecuencia que se dejara de detectar la unión entre Rim8 y Vps23 en el sistema de doble híbrido (Figura R-1).

Para intentar definir posibles elementos en Rim8 implicados en su interacción con Vps23, hicimos un alineamiento múltiple con secuencias C-terminales de proteínas homólogas a Rim8 pertenecientes a otros hongos. Este abordaje se justifica porque, generalmente, los residuos o motivos proteicos de interacción se conservan a lo largo de la evolución cuando están implicados en interacciones de importancia fisiológica. Este alineamiento puso de manifiesto que en el extremo C-terminal Rim8 de *S. cerevisiae* existe una secuencia corta conservada, a la que hemos denominado “caja 1” (Figura R-3). Además, determinamos que en *C. albicans* existe una secuencia relacionada, “caja 2”, mientras que ambas, caja 1 y caja 2, están presentes en *A. nidulans* y *Y. lipolytica* (Figura R-3).

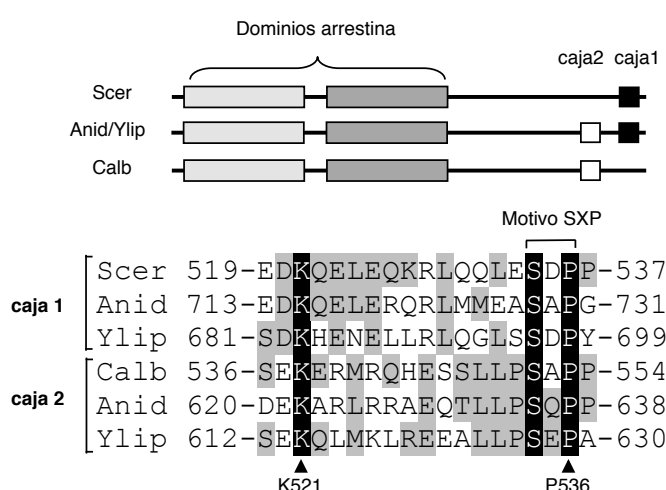


Figura R-3: Conservación de las secuencias de la caja 1 y la caja 2 en miembros de la familia de Rim8. Se muestra en la parte superior una representación (no a escala) en la que se indican las posiciones de los dominios arrestina y de las secuencias de la caja 1 y la caja 2 en la proteína Rim8 de *S. cerevisiae* (Scer), *Y. lipolytica* (Ylip) y *C. albicans* (Calb) y en la proteína PalF de *A. nidulans* (Anid). El alineamiento muestra las secuencias conservadas relacionadas presentes en la caja 1 y en la caja 2. Se destacan con fondo negro los residuos totalmente conservados y con fondo gris los similares (según la matriz de sustitución BLOSUM62). Se señalan las posiciones de los residuos totalmente conservados P536 y K521.

Además de con estos nuevos datos, contábamos con que en estudios anteriores se había demostrado que el dominio UEV (ubiquitina E2 variant) de Vps23 interacciona con los motivos PSDP y PTPV en Vps27 [82, 26]. Nos pareció interesante, el hecho de que en la caja 1 de Rim8 se encuentre altamente conservado un motivo SXP (SDP; codones 534 a 536) y que se corresponda con un motivo PSXP en la caja 2 (Figura R-3). Para comprobar si este motivo en concreto pudiera ser responsable de la interacción con Vps23 introdujimos una mutación que lo elimina por completo, sustituyéndolo por residuos de alanina, ESDP(533-536)/AAAA. Los experimentos mostraron que esta mutación anula la interacción *in vitro* y en el sistema de doble-híbrido de Rim8 con Vps23 (Figura R-1 y R-4) pero no la de Rim8 con la cola C-terminal de Rim21 (Figura R-1).

Resultados

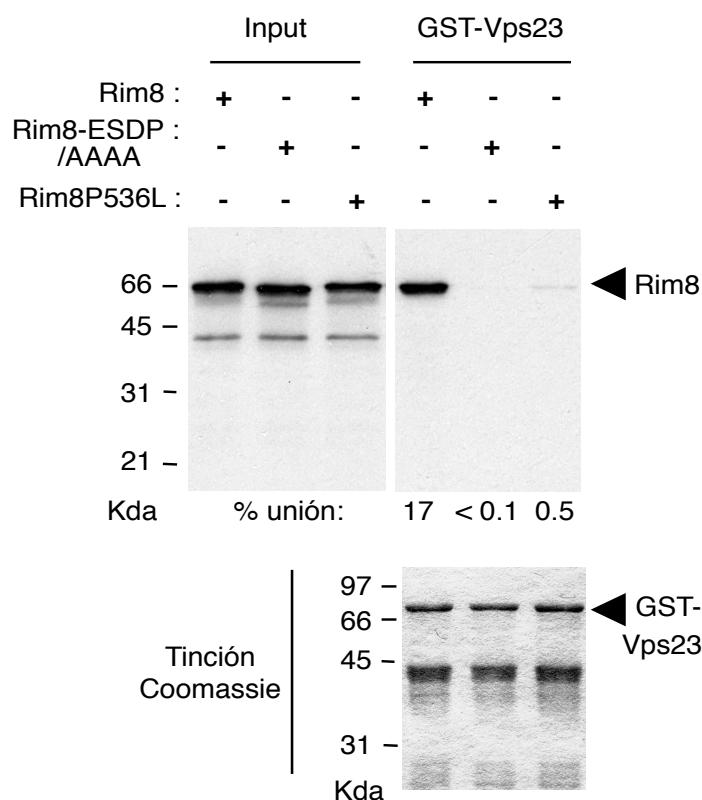


Figura R-4: **Unión *in vitro* de Rim8 a Vps23 dependiente del motivo SXP de Rim8.** GST-Vps23 y GST fueron fijados en perlas de glutatión-Sefarosa. Posteriormente, estas fusiones fueron incubadas con Rim8 (silvestre o el mutante indicado) sintetizado *in vitro* y marcado con metionina [³⁵S]. Tras el ensayo de interacción, las proteínas fueron separadas en geles de SDS-poliacrilamida al 10% y detectadas mediante autoradiografía (panel superior) o por tinción de Coomassie (panel inferior). Los "input" representan las proteínas sintetizadas *in vitro* que se usaron para los experimentos de unión (20% de la cantidad incubada en el ensayo). Los porcentajes de unión indicados corresponden a la fracción del total de la proteína incubada que se unió a la fusión GST-Vps23.

Además, mostramos que los 15 residuos C-terminales de Rim8 (codones 528 a 542), que contienen el motivo SXP, son suficientes para mediar la interacción con Vps23 en el sistema de doble-híbrido (Figura R-1).

Por último, demostramos que el dominio UEV de Vps23 (codones 1-161), que media en la interacción de Vps23 con Vps27, es suficiente para la interacción con Rim8 (Figura R-1).

Un estudio anterior mostró que la unión del homólogo en mamíferos de Vps23, Tsg101, al motivo relacionado P(T/S)AP en la proteína Gag del VIH es muy dependiente del segundo residuo de prolina, ya que su sustitución por un residuo de leucina reduce fuertemente la unión al dominio UEV de Tsg101 [55]. Nuestros datos indican que la interacción en doble-híbrido de Rim8 con Vps23 se anula al introducir la sustitución P536L en el motivo SXP (Figura R-1). Sin embargo, al contrario que la sustitución ESDP(533/536)/AAAA, que anula por completo la interacción tanto *in vitro* como en doble híbrido, la sustitución P536L permite que se mantenga una unión residual a Vps23 *in vitro* (Figura R-4), lo que sugiere que esta mutación no inactiva completamente el motivo SXP. En suma, estos descubrimientos indican que el motivo SXP conservado en la caja 1 de Rim8 es un sitio de unión para Vps23.

Rim8 se monoubicuitila en un residuo de lisina situado en su extremo C-terminal.

Rim8 contiene en su caja 1 un residuo de lisina (K521) muy conservado situado 12 residuos aguas arriba del motivo SXP (Figura R-3). Ya que el homólogo de Rim8 en *A. nidulans* se ubicuitila [71], nos preguntamos si el residuo de K521 podría ser un sitio de ubicuitilación. Para comprobarlo, realizamos extractos proteicos procedentes de levaduras que expresan, a niveles fisiológicos, Rim8 etiquetado con 3 epítomos Flag. Partiendo de estos extractos hicimos una inmunoprecipitación con anticuerpos α -Flag y por inmunoblot analizamos la

movilidad electroforética de las proteínas unidas. En el análisis con anticuerpos α -Flag se detectó una banda mayoritaria que migra a la altura de los 62 Kda y dos bandas secundarias de menor movilidad (Figura R-5A, carril 1).

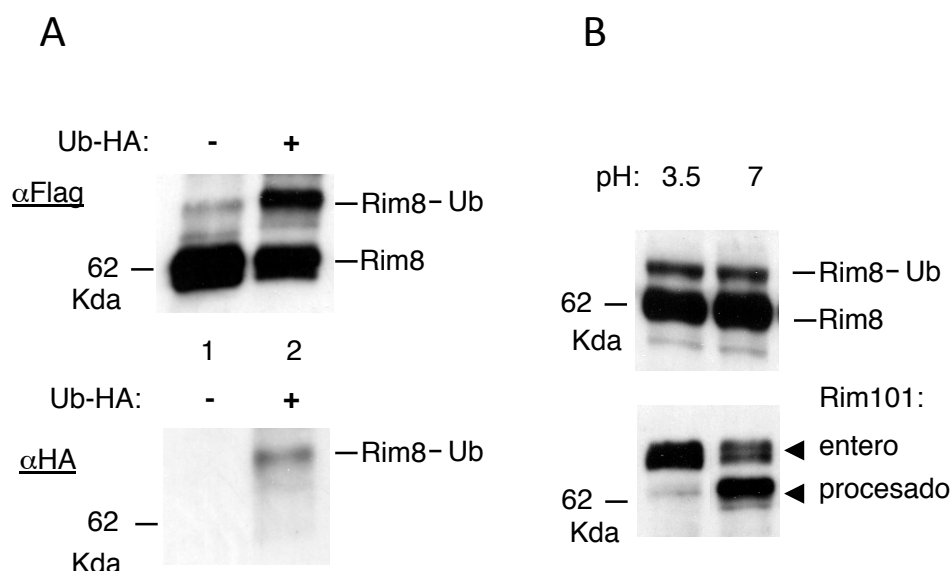


Figura R-5: **Ubicuitilación de Rim8 independiente de pH.** (A-B) Análisis por inmunoblot de Rim8 y Rim101 etiquetados con epítomos Flag o HA. (A) La cepa MHY501 (silvestre) fue cotransformada con el plásmido pFlag-Rim8 y, o bien Yep112 (Ub-HA, +) o el vector control pRS424 (-). Las células fueron cultivadas en presencia de 100 μ M de CuSO₄ para sobreexpresar ubiquitina (Ub) etiquetada con HA desde el promotor *CUP1* del plásmido Yep112. Se realizó una inmunoprecipitación con anticuerpo α -Flag y las proteínas unidas se analizaron por inmunoblot con anticuerpo α -HA para observar la ubiquitina-HA (panel inferior) y α -Flag para observar Flag-Rim8 (panel superior). (B) Panel superior. La cepa Y04414 (Δ rim8) fue transformada con pHA-Rim8. Se realizó un cultivo a partir del cual se preparó un extracto proteico antes y después de un cambio de pH 3.5 a pH7. Estos extractos fueron analizados por inmunoblot con anticuerpo α -HA. Panel inferior: la cepa OVY25 (Δ rim8, *RIM101-HA*) fue transformada con pFlag-Rim8. Se realizó un cultivo a partir del cual se preparó un extracto proteico antes y después de un cambio de pH 3.5 a pH 7. Estos extractos fueron analizados por inmunoblot con anticuerpo α -HA para visualizar el factor de transcripción Rim101, cuyas formas entera y procesada se indican con flechas.

Para comprobar si una de las bandas de menor movilidad corresponde a Rim8 modificado con ubiquitina, cotransformamos la levadura con el vector que expresa Flag-Rim8 y con un plásmido de sobreexpresión de ubiquitina etiquetada con un epítipo HA. La banda superior incrementa notablemente y modifica ligeramente su movilidad electroforética (Figura R-5A, carril 2, panel superior). Además, inmunoreacciona con α -HA, por lo que corresponde a una modificación de Rim8 con ubiquitina (Figura R-5A, carril 2, panel inferior). De este modo, al igual que PalF en *A. nidulans*, Rim8 se ubiquitila.

Inesperadamente, observamos que Rim8, al contrario que PalF, se encuentra ubiquitilado en extractos proteicos totales de manera independiente del pH del medio de cultivo (Figura R-5B, panel superior), aunque el mismo incremento en el pH ambiental active la ruta *RIM* y provoque el procesamiento de Rim101 (Figura 5B, panel inferior).

Resultados

Un estudio previo mostró que en un mutante $\Delta doa4$ la cantidad de ubiquitina libre en la célula está reducida. Este efecto se puede restaurar y devolver la ubiquitina a sus niveles normales si se expresa ubiquitina bajo el promotor inducible por cobre *CUP1* sin añadir cobre extra al medio de cultivo [125]. Estas características nos aportaron una herramienta para caracterizar mejor la ubiquitilación de Rim8. De acuerdo con este estudio, los análisis por inmunoblot de HA-Rim8 mostraron que Rim8 ubiquitilado es indetectable en un mutante $\Delta doa4$, pero que esta situación se revierte expresando ubiquitina bajo el control del promotor *CUP1* sin añadir cobre extra al medio (Figura R-6A, carriles 2 y 3).

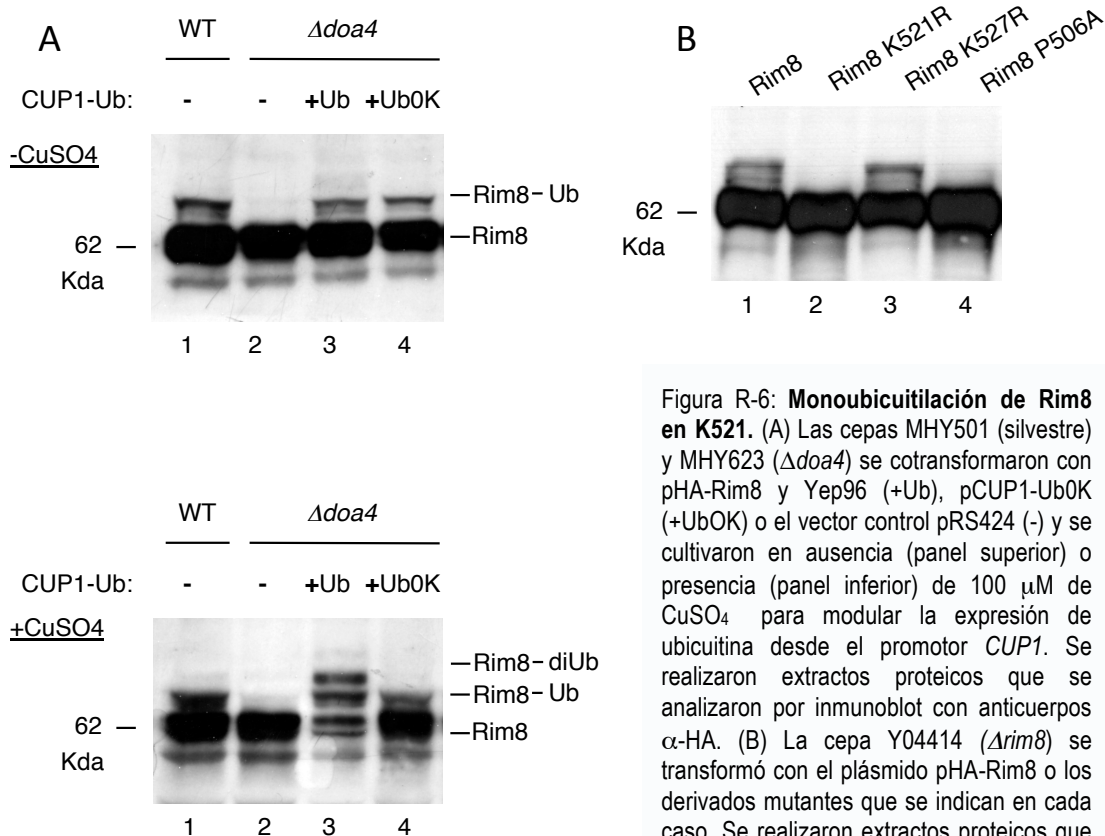


Figura R-6: **Monoubicuitilación de Rim8 en K521.** (A) Las cepas MHY501 (silvestre) y MHY623 ($\Delta doa4$) se cotransformaron con pHA-Rim8 y Yep96 (+Ub), pCUP1-UbOK (+UbOK) o el vector control pRS424 (-) y se cultivaron en ausencia (panel superior) o presencia (panel inferior) de 100 μ M de CuSO₄ para modular la expresión de ubiquitina desde el promotor *CUP1*. Se realizaron extractos proteicos que se analizaron por inmunoblot con anticuerpos α -HA. (B) La cepa Y04414 ($\Delta rim8$) se transformó con el plásmido pHA-Rim8 o los derivados mutantes que se indican en cada caso. Se realizaron extractos proteicos que se analizaron por inmunoblot con anticuerpos α -HA.

Este hecho supone un indicio adicional al hecho de que efectivamente la modificación de Rim8 es por ubiquitilación, pero además, con este mutante tenemos la posibilidad de profundizar en la naturaleza de esta modificación. Por el tamaño de la banda superior de Rim8, se podía intuir que correspondía a la adición de una única molécula de ubiquitina (monoubicuitilación). Para comprobar esta posibilidad hemos restaurado los niveles de ubiquitina del mutante $\Delta doa4$ a niveles fisiológicos expresando una ubiquitina que carece de todos sus residuos de lisina (UbOK), la cual impide la formación de cadenas de ubiquitina. El resultado obtenido es el mismo que con la ubiquitina silvestre (Figura R-6A, carril 4), lo que indica que la banda de menor movilidad detectada en la cepa silvestre representa Rim8 monoubicuitilado. En paralelo, experimentos control muestran que la sobreexpresión de ubiquitina por adición de cobre extra al medio de cultivo provoca que se forme una banda adicional, que no se detecta cuando se sobreexpresa UbOK (Figura R-6A, panel inferior, comparar carril 3

y 4). Esta banda corresponde, atendiendo a su tamaño, a Rim8 diubiquitilado, lo que es coherente con datos publicados anteriormente que afirman que en un mutante $\Delta doa4$ se acumulan poblaciones de di-ubiquitina cuando se sobreexpresa ubiquitina [125].

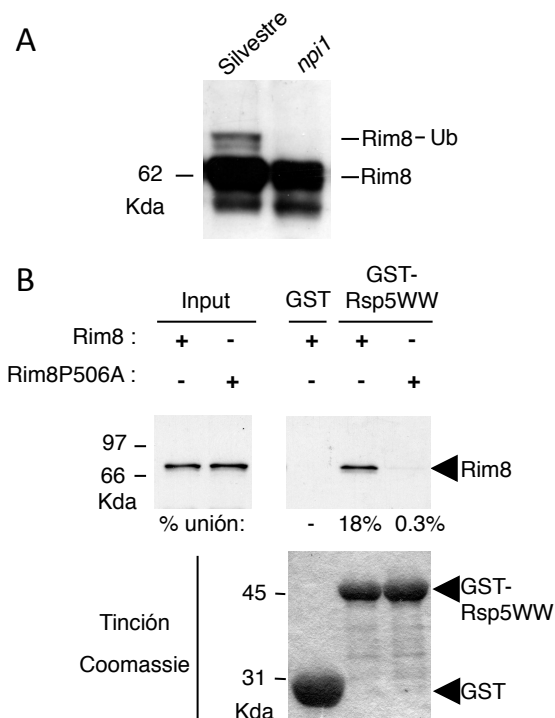
Lo siguiente que examinamos fue si el residuo K521 muy conservado en la caja 1 de Rim8 está implicado en su ubiquitilación. Los análisis por inmunoblot de HA-Rim8 mostraron que la sustitución K521R anula la ubiquitilación de Rim8 (Figura R-6B, carril 2). La sustitución como control de un segundo residuo de lisina en la caja 1 de Rim8, K527, sin embargo, no provocó efecto observable alguno (Figura 6B, carril 3). Así, podemos decir que Rim8 está monoubiquitilado, al menos de forma muy preferencial, en el residuo K521 de su extremo C-terminal.

La ubiquitilación de Rim8 depende de la E3 ubiquitina ligasa Rsp5, que se une a un motivo PXY en Rim8.

Para intentar identificar qué ubiquitina ligasa está implicada en la modificación de Rim8, nos basamos en los datos disponibles sobre la ubiquitilación de las arrestinas en mamíferos. En estos estudios se demostró que la β -arrestina-1 interacciona con AIP4/Itch, una E3 ubiquitina ligasa de la familia de Nedd4, regulando así el tráfico endosomal del receptor CXCR4 [23]. Teniendo en cuenta que Rim8 interacciona con un componente de la maquinaria asociada al endosoma, ESCRT, examinamos si Rsp5, el único miembro de la familia de Nedd4 en levaduras, está implicado en la ubiquitilación de Rim8.

Para iniciar este abordaje, nos enfrentamos a la dificultad de que *RSP5* es un gen esencial para la viabilidad. Sin embargo, se ha descrito un mutante denominado *npi* que produce niveles muy bajos de Rsp5, y que, aunque suficientes para mantener la viabilidad, pueden facilitar la observación de defectos moleculares asociados a la ubiquitilación [180]. Los análisis por inmunoblot de HA-Rim8 mostraron que su ubiquitilación es indetectable en un mutante *npi* (Figura R-7A). Este resultado sugiere que Rsp5 es responsable de la ubiquitilación de Rim8.

Figura R-7: La E3 ubiquitina ligasa Rsp5, que se une a un motivo PXY en el extremo C-terminal de Rim8, es necesaria para que Rim8 se ubiquitile. (A) Ubiquitilación de Rim8 en un mutante *npi*. Las cepas 23346c (silvestre) y 27038a (*npi1*) fueron transformadas con el plásmido pHA-Rim8(U). Se prepararon extractos proteicos y se analizaron por inmunoblot con anticuerpos α -HA. (B) Unión *in vitro* de Rim8 a los dominios WW de Rsp5 dependiente del motivo PXY de Rim8. GST-Rsp5WW y GST fueron fijados en perlas de glutatión-Sefarosa. Posteriormente, estas fusiones fueron incubadas con Rim8 (silvestre o el mutante indicado) sintetizado *in vitro* y marcado con metionina [35 S]. Tras el ensayo de interacción, las proteínas unidas fueron separadas en geles de SDS-poliacrilamida al 10% y detectadas mediante autoradiografía (panel superior) o por tinción de Coomassie (panel inferior). Los "input" representan las proteínas sintetizadas *in vitro* que se usaron para los experimentos de unión (20% de la cantidad incubada en el ensayo). Los porcentajes de unión indicados corresponden a la fracción del total de la proteína incubada que se unió a la fusión GST-Rsp5WW.



Resultados

Sin embargo, no se puede descartar que este efecto esté mediado por Rsp5 solo de manera indirecta a través de su modulación de otras ubiquitina ligasas. Para intentar ganar certeza en la implicación directa de Rsp5 en la ubiquitilación de Rim8, hemos estudiado si estas dos proteínas interactúan *in vitro*. Rsp5 reconoce un gran número de sustratos a través de sus dominios WW [60]. Por ello, probamos si Rim8 interactúa con los dominios WW de Rsp5 en ensayos de unión *in vitro*. Para realizarlos, hemos generado una fusión de GST a los dominios WW de Rsp5 (codones 228-430) y la hemos expresado en bacterias y purificado. Nuestros resultados indican que Rim8 sintetizado *in vitro* y marcado con metionina [³⁵S] se une directamente a los dominios WW de Rsp5 (Figura R-7B). En la literatura, está publicado que los dominios WW de Rsp5 se unen a motivos PPXY o PXY [37]. En Rim8 y sus homólogos en otras especies de *Saccharomyces* existe un motivo PXY (PKY, codones 506-508) muy conservado, que está localizado 12 residuos aguas arriba del residuo de lisina monoubicuitilado en el extremo C-terminal de Rim8 (Figura R-1). La unión *in vitro* de Rim8 con la fusión GST-Rsp5WW se elimina mediante la sustitución P506A en el motivo PXY (Figura R-7B), lo que sugiere que este motivo media en la interacción directa detectada entre estas dos proteínas. Para comprobar si *in vivo* esta interacción tiene algún efecto sobre la ubiquitilación de Rim8, estudiamos el efecto de la sustitución P506A en extractos celulares. Analizamos por inmunoblot extractos proteicos de levaduras que expresaban HA-Rim8 y comprobamos que la sustitución P506A elimina casi por completo la ubiquitilación de Rim8 (Figura 6B, carril 4), lo cual indica que el motivo PXY de Rim8 media en una interacción funcional con Rsp5.

El motivo SXP y el residuo monoubicuitilado de Rim8 contribuyen a su unión *in vivo* con Vps23.

Para investigar el papel fisiológico del residuo monoubicuitilado y del motivo SXP de Rim8, examinamos el efecto sobre la señalización por la ruta *RIM* de mutaciones que inactivan uno o los dos elementos. Analizamos la actividad de la ruta *RIM* en estos mutantes mediante el seguimiento del procesamiento del factor de transcripción Rim101 y de la expresión del gen reportero *CYC1-NRE-lacZ* en el cual *lacZ* está bajo el control del elemento regulador NRE reprimido por Rim101. Además, realizamos un análisis fenotípico de crecimiento en presencia de litio, ya que los mutantes *rim* son sensibles a este compuesto. Este efecto se debe a que la expresión de la ATPasa, Ena1, que constituye el principal sistema de salida de sodio y litio, se encuentra bajo el control transcripcional de Rim101 (Figura R-8, ver esquema).

En concordancia con estudios anteriores [155, 105, 203], la inactivación de la ruta *RIM* en un mutante $\Delta rim8$ bloquea el procesamiento del factor de transcripción Rim101 (Figura R-8A, carril 3), activa el reportero reprimido por Rim101 *CYC1-NRE-lacZ* (Figura R-8B, carril 3) y impide el crecimiento en presencia de litio en el medio de cultivo (Figura R-8C, carril 3). El truncamiento del extremo C-terminal de Rim8 (codones 505-542), que contiene el residuo ubiquitilado y el motivo SXP, provocó igualmente una pérdida de función de la proteína (Figura R-8, carril 2). La sustitución ESDP(533-536)/AAAA, que elimina el motivo SXP y anula la interacción con Vps23, también produjo un fenotipo de pérdida de función (Figura R-8, carril 8) lo que indica que la unión de Vps23 al motivo SXP de Rim8 tiene un papel esencial en la transmisión de la señal por la ruta Rim. Por el contrario, la sustitución P536L, que permite una interacción residual con Vps23, o la sustitución K521R, que inactiva la ubiquitilación de este residuo, no tuvo efectos detectables sobre la función de Rim8 con la excepción de un muy ligero defecto en el crecimiento en presencia de Litio (Figura R-8, carriles 4 y 5). Sorprendentemente,

una combinación de ambas sustituciones, P536L y K521R, produjo un fuerte fenotipo de pérdida de función (Figura R-8, carril 6). En conjunto, estos resultados muestran que inactivar parcialmente el motivo SXP mediante la sustitución P536L no es suficiente para bloquear la ruta, a menos que el residuo ubiquitilado sea mutado también. Tomando en cuenta que el dominio UEV de Vps23 responsable de la unión con el motivo SXP, también une ubiquitina [83], estos resultados encajarían bien con la hipótesis de que el residuo ubiquitilado de Rim8 contribuya a la interacción con Vps23 *in vivo*.

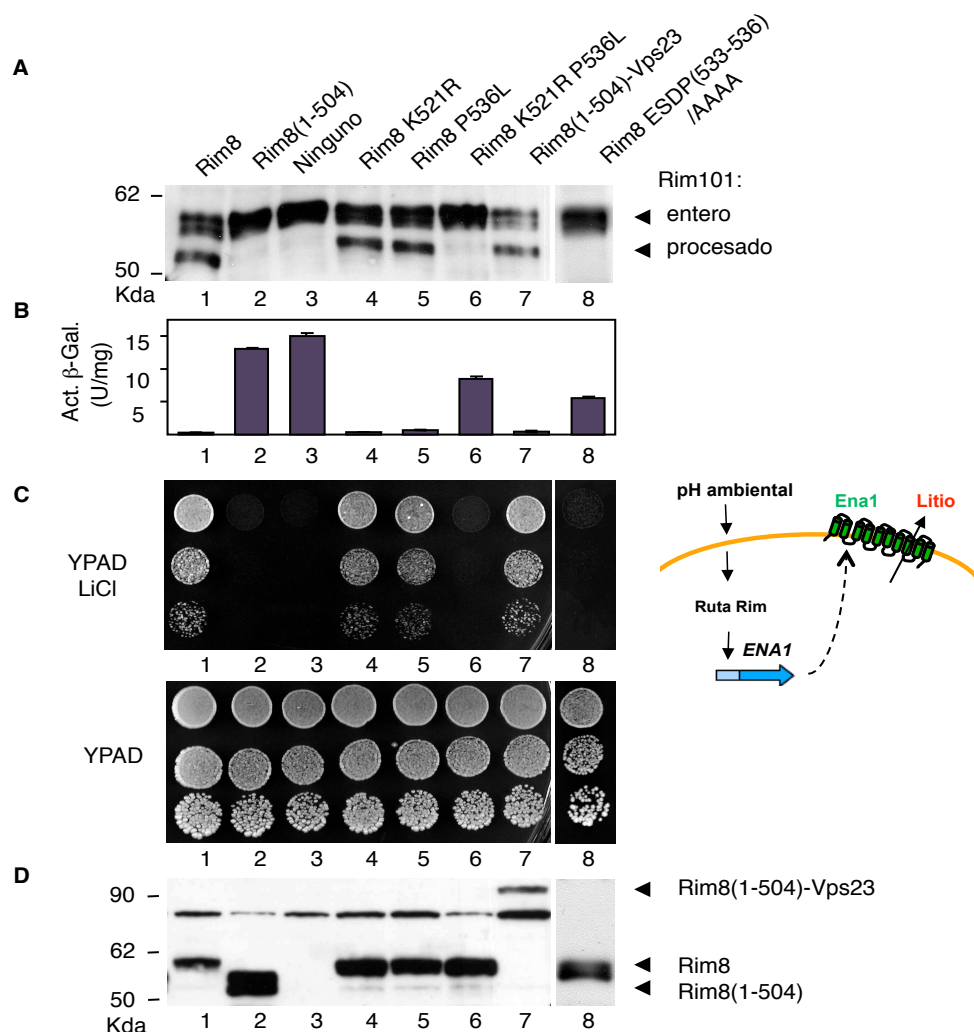


Figura R-8: Efectos de mutaciones en la región C-terminal de Rim8 sobre la señalización por la ruta Rim. (A-C) Análisis funcional para comprobar si los plásmidos que expresan los mutantes de Rim8 indicados restauran la funcionalidad de la ruta RIM en una cepa $\Delta rim8$. Los plásmidos usados fueron pFlag-Rim8, el vector control pRS313 (vacío) o los derivados mutantes de pFlag-Rim8 indicados en cada caso. (A) Procesamiento de Rim101 etiquetado con HA en la cepa OVY25 ($\Delta rim8$, RIM101-HA) transformada con los plásmidos pFlag-Rim8 indicados en cada caso. Se realizaron extractos proteicos que se analizaron por inmunoblot con anticuerpos α -HA para detectar Rim101-HA. Se señalan las posiciones de las bandas correspondientes a la forma entera y procesada de Rim101. (B) Y04414 ($\Delta rim8$) fue cotransformada con el plásmido pLGn+3xNRE22D, portador de un gen testigo CYC1-NRE-lacZ, y con los plásmidos pFlag-Rim8 indicados. Los valores corresponden a la media de la actividad β -galactosidasa de dos transformantes. (C-D) Y04414 ($\Delta rim8$) fue transformada con los plásmidos pFlag-Rim8 indicados. (C) Las células transformadas fueron cultivadas en medio mínimo hasta que alcanzaron la fase estacionaria. Se prepararon diluciones seriadas que fueron transferidas a una placa de YPAD (panel superior) o a una placa de YPAD que contenía 200mM de LiCl (panel inferior). A la derecha se muestra un esquema explicativo del mecanismo por el que la actividad de la ruta RIM es requerida para el crecimiento en presencia de LiCl. (D) A partir de los mismos transformantes, se prepararon extractos proteicos que fueron analizados por inmunoblot con anticuerpos α -Flag para confirmar la expresión de Flag-Rim8, sus derivados mutantes y la quimera Rim8-Vps23.

Resultados

Para analizar el posible papel de la ubiquitilación de Rim8 en la unión a Vps23, usamos dos abordajes distintos. En los abordajes de doble híbrido, al sobreexpresar las proteínas de fusión, puede suceder que algunos componentes celulares implicados en la interacción actúen como factores limitantes, dificultando o impidiendo la detección de algunas interacciones. Como es posible que este sea el caso de la ubiquitilación de Rim8, lo primero que examinamos fue si la sobreexpresión de ubiquitina restaura la interacción entre Vps23 y Rim8-P536L, que contiene un motivo SXP parcialmente inactivado y no suficiente para permitir la interacción por sí solo en el sistema de doble-híbrido. La interacción entre Vps23 y el mutante Rim8-P536L se restaura hasta alrededor del 5% de los niveles silvestres cuando se sobreexpresa ubiquitina. Además, este efecto es dependiente de la integridad del residuo ubiquitilado K521 ya que no se detecta interacción entre Vps23 y el doble mutante Rim8-K521R-P536L (Figura R-9). En contraposición con el mutante Rim8-P536L, Rim8-ESDP(533-536)/AAAA no interacciona con Vps23 aunque se sobreexprese ubiquitina (Figura R-9), lo que corrobora que la sustitución P536L no inactiva del todo el motivo SXP.

LexA-Rim8	GAD-Vps23	CUP1-Ub	Actividad β -Galactosidasa (U)
Silvestre	Silvestre	-	341
P536L	Silvestre	-	<1
P536L	Silvestre	+	20
K521R-P536L	Silvestre	+	<1
P536L	SDG(55-57)/AAA	+	<1
ESDP(533-536)/AAAA	Silvestre	+	<1

Figura R-9: **Interacción entre Rim8 y Vps23 mediada por ubiquitina.** Las fusiones de Rim8 a LexA, que contienen las mutaciones indicadas, fueron utilizadas en un ensayo de doble-híbrido para analizar su interacción con GAD-Vps23 y con su derivado mutante GAD-Vps23[SDG(55-57)AAA] en presencia del vector Yep96 de expresión de ubiquitina (+) o de el vector control pRS424 (-). La cepa utilizada fue CTY10-5d. Los transformantes fueron cultivados en presencia de 100 μ M de CuSO₄ para sobreexpresar ubiquitina desde el promotor *CUP1* de Yep96. Los valores corresponden a la media de las actividades β -galactosidasa medidas en cuatro transformantes. Los errores estándar son menores del 18%.

Después, nos interesamos por analizar la interacción de Vps23 con Rim8 procedente de extractos celulares, en los cuales esta proteína se encuentra ubiquitilada. Para ello, realizamos ensayos de unión *in vitro* usando como cebo una fusión el dominio UEV de Vps23 a GST expresada en bacterias y purificada; analizamos si interacciona con Rim8 de extractos de levadura. Sobreexpresamos ubiquitina para mejorar la detección de Rim8 ubiquitilado ya que en una cepa silvestre la proporción de esta forma modificada de Rim8 es muy

minoritaria. De acuerdo con el papel de la ubiquitina en la interacción entre Vps23 y Rim8, observamos que el dominio UEV de Vps23 se une de manera preferencial a la forma ubiquitilada de Rim8 (Figura R-10, carril 3). Sin embargo, la ubiquitilación de Rim8 no mejora la interacción mediada por el motivo PXY con los dominios WW de Rsp5 (Figura R-10, carril 4), lo que descarta que estemos antes un simple problema de accesibilidad de la forma no ubiquitilada. En conjunto estos datos confirman el hecho de que la ubiquitilación de Rim8 contribuye a la unión a Vps23.

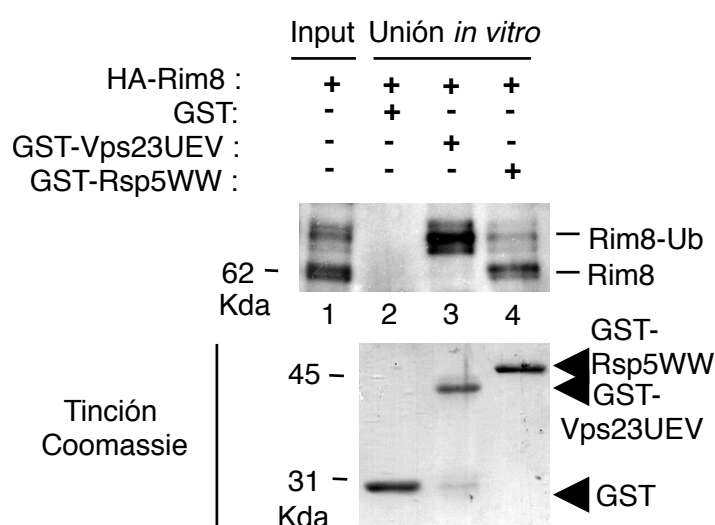


Figura R-10: Interacción *in vitro* de Rim8 ubiquitilado con el dominio UEV de Vps23 y con los dominios WW de Rsp5. Se transformó la cepa Y04414 ($\Delta rim8$) con los plásmidos pHA-Rim8 y Yep96. Las células transformadas se cultivaron en presencia de 100 μ M de $CuSO_4$ para sobreexpresar ubiquitina desde el promotor *CUP1* de Yep96. Se realizaron extractos proteicos que fueron incubados con perlas de glutatión-sefarosa unidas a GST-Rsp5WW, GST-Vps23UEV o GST. Las proteínas unidas se analizaron separándolas en geles de SDS-poliacrilamida al 10% y se detectaron por inmunoblot con anticuerpos α -HA (panel superior) o por tinción de Coomassie (panel inferior). El “input” representa el extracto proteico utilizado para los experimentos de unión (2% de la cantidad incubada en el ensayo).

Estudios previos mostraron que una fusión traduccional del homólogo en mamíferos de Vps23, Tsg101, a la proteína Gag del VIH permite que se produzca la gemación de los retrovirus prescindiendo del motivo PTAP de unión a Tsg101 [117]. Por ello, analizamos si se puede recuperar la funcionalidad de Rim8 truncado en su extremo C-terminal (codones 1-504) fusionándolo a Vps23. Es conveniente recordar que es en esta región donde se localizan tanto el motivo SXP como del residuo ubiquitilado K521. La quimera Rim8(1-504)-Vps23 restaura totalmente la funcionalidad de Rim8 (Figura R-8, comparar carriles 2 y 7). De este modo, los resultados indican que el papel esencial del extremo C-terminal de Rim8, al igual que el de el motivo PTAP del extremo C-terminal de la proteína Gag del VIH, es el de reclutar Vps23/Tsg101.

Rim8 está asociado con las subunidades Vps23 y Vps28 de ESCRT-I de manera independiente del pH ambiental.

Aunque hemos estudiado por diferentes aproximaciones la interacción entre Vps23 y Rim8, hemos querido demostrar que *in vivo* estas dos proteínas están realmente asociadas. Para ello, realizamos experimentos de coinmunoprecipitación a partir de extractos celulares. Estos extractos proceden de un mutante $\Delta rim8$ cotransformado con plásmidos centroméricos que permiten la expresión de Rim8-HA y Vps23-Flag desde sus propios promotores. Esto último es importante porque nos evita tener que considerar posibles artefactos derivados de la sobreexpresión de proteínas (Figura R-11).

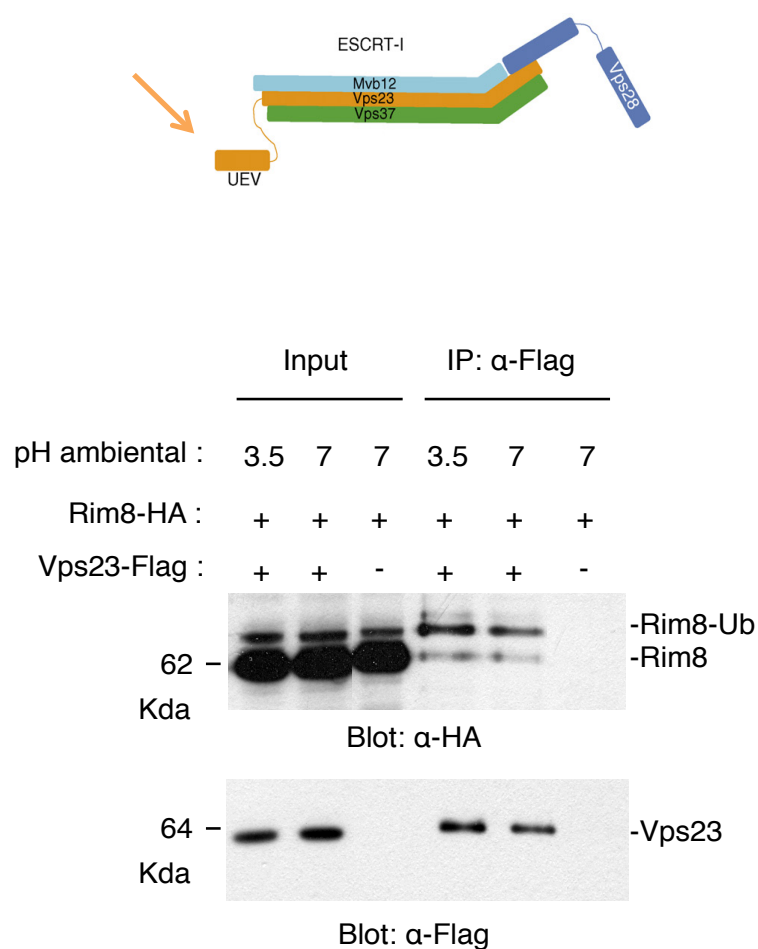


Figura R-11: **Interacción *in vivo* de Rim8 y Vps23.** En la zona superior se representa esquemáticamente el complejo ESCRT-I y se señala la subunidad Vps23, que hace contacto directo con Rim8 (tomado y modificado de Saksena *et al.* [160]). Debajo se muestra un ensayo de coinmunoprecipitación de Rim8 y Vps23 procedentes de extractos celulares. La cepa Y04414 ($\Delta rim8$) fue cotransformada con los plásmidos pRim8-HA y con pVps23-Flag (+) o con el vector control pRS316 (-). Se inmunoprecipitaron con anticuerpo α -Flag 400 μ g de extractos proteicos preparados antes y después de someter las células a un choque de pH 3.5 a pH7. La fracción resultante se analizó por inmunoblot con anticuerpo α -HA para detectar Rim8 (90% del total de la fracción unida, panel superior) o con anticuerpo α -Flag para detectar Vps23 (10% del total de la fracción unida, panel inferior). El "input" representa una fracción (12 μ g) del extracto proteico.

Para comprobar si la posible interacción está regulada por el pH ambiental, se coinmunoprecipitaron extractos proteicos de levaduras recogidas antes y después de un cambio de pH en el medio de cultivo (pH3.5 a pH7). La coinmunoprecipitación con α -Flag y posterior análisis con α -HA y α -Flag de las proteínas asociadas mostró que una fracción de Rim8 se encuentra unida a Vps23 en extractos celulares de forma independiente de pH (Figura R-11). Además, y de acuerdo con los ensayos de unión *in vitro* con extractos proteicos (Figura R-10), Vps23 está asociado de manera preferencial con Rim8 ubiquitilado, aunque una fracción de proteína no ubiquitilada se detectó también en los inmunoprecipitados. En experimentos control, Rim8-HA no se unió al

anticuerpo α -Flag en ausencia de Vps23-Flag (Figura R-11). Estos resultados refuerzan el papel de la ubiquitilación de Rim8 en la unión a Vps23 y sugieren que la interacción entre Rim8 y Vps23 es independiente de la señal de pH. Un estudio previo mostró que otros componentes del complejo ESCRT-I también eran esenciales en la ruta *RIM* [204]. Por ello, analizamos la asociación de Rim8 con otra de las subunidades de ESCRT-I, Vps28. Una cepa $\Delta rim8$ que expresa Vps28-Flag desde su propio locus fue transformada con un plásmido centromérico que permite la expresión de Rim8-HA desde su propio promotor. Se prepararon extractos proteicos que se inmunoprecipitaron con anticuerpos α -Flag. Esta fracción se sometió a inmunoblot. El análisis con α -HA de estos inmunoprecipitados muestra que Rim8 ubiquitilado también coimmunoprecipita con Vps28-Flag (Figura R-12). Por lo tanto, Rim8 coimmunoprecipita tanto con Vps23 como con Vps28, lo que indica que, con mucha probabilidad, la unión de Rim8 a Vps23 media la interacción de Rim8 con el complejo ESCRT-I.

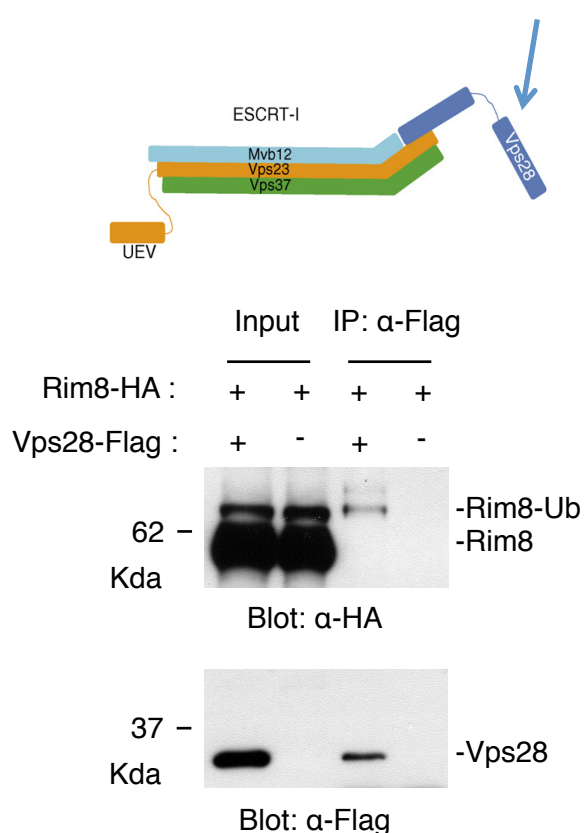


Figura R-12: **Interacción *in vivo* de Rim8 y Vps28**: En la zona superior se muestra un esquema del complejo ESCRT-I en el que se señala la subunidad Vps28, que hace contacto directo con el complejo ESCRT-II (tomado y modificado de Saxena *et al.* [160]). Debajo se muestra un ensayo de coimmunoprecipitación de Rim8 y Vps28 procedentes de extractos celulares. Las cepas Y04414 ($\Delta rim8$) y OVY121 ($\Delta rim8$ Vps28-Flag) fueron transformadas con el plásmido pRim8-HA(U) y cultivadas hasta fase logarítmica (pH final 3.5). Se inmunoprecipitaron con anticuerpo α -Flag 400 μ g de extractos proteicos. La fracción resultante se analizó por inmunoblot con anticuerpo α -HA (90% del total de la fracción unida, panel superior) o con anticuerpo α -Flag (10% del total de la fracción unida, panel inferior). El "input" representa una fracción (12 μ g) del extracto proteico.

Bloque 2: Mecanismos de monoubicuitilación de Rim8.

La ubiquitilación de Rim8 es independiente de la activación de la ruta Rim, pero dependiente de la interacción del dominio UEV de Vps23 con el motivo SXP y la ubiquitina.

La ubiquitilación de PalF, el homólogo en *A. nidulans* de Rim8, es dependiente de la señal de pH y de la proteína 7TM PalH, parcialmente dependiente de la proteína 3TM Pall e independiente de los otros componentes específicos de la ruta de pH [71]. Con el fin de analizar qué componentes celulares, participantes de la ruta Rim, están implicados en la ubiquitilación de Rim8, hemos analizado una serie de cepas mutantes de las que se ha eliminado en cada caso uno de los genes de la ruta.

Al analizar sus correspondientes extractos proteicos para visualizar el estado de Rim8, se puso de manifiesto que la ubiquitilación de esta proteína es independiente de cualquiera de los componentes específicos de la ruta Rim, incluyendo Rim21 y Dfg16, los dos homólogos en levadura del putativo sensor de pH, PalH (Figura R-13). Este resultado es sorprendente ya que difiere completamente de los datos obtenidos en *A. nidulans*. Sin embargo, es coherente con el hecho de que la ubiquitilación de Rim8 no esta regulada por el pH ambiental (Figura R-5). Sin embargo, inesperadamente, observamos que la ubiquitilación de Rim8 no se detecta en una cepa mutante $\Delta vps23$ (Figura R-13).

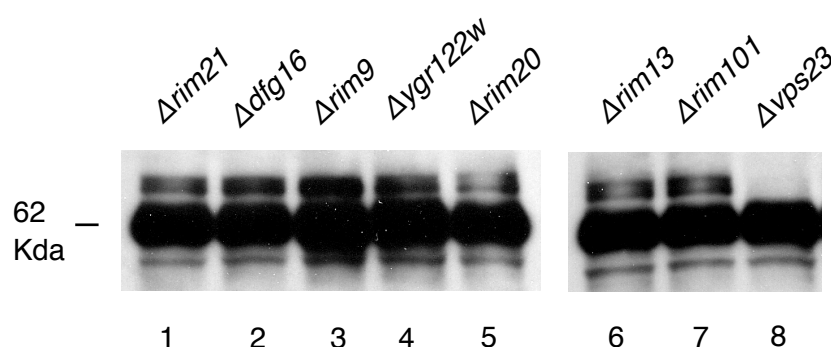


Figura R-13: **La ubiquitilación de Rim8 es dependiente de Vps23.** Las cepas Y01150 ($\Delta rim21$), Y11806 ($\Delta dfg16$), Y06196 ($\Delta rim9$), Y04752 ($\Delta ygr122w$), Y07333 ($\Delta rim20$), Y06643 ($\Delta rim13$), Y00936 ($\Delta rim101$) y Y03416 ($\Delta vps23$) se transformaron con el plásmido pHA-Rim8. Se prepararon extractos proteicos y se analizaron por inmunoblot con anticuerpos α HA.

De este modo, la ubiquitilación de Rim8 es independiente de la activación de la ruta *RIM* (Figura R-5), pero estrictamente dependiente de la presencia de su interactor, Vps23. Vps23, tal y como demostramos en los ensayos de doble-híbrido (Figura R-1) interacciona con Rim8 a través de su dominio UEV. Por ello, nos preguntamos si la sobreexpresión del dominio UEV de Vps23 sería suficiente para restaurar la ubiquitilación de Rim8 en ausencia de Vps23. Los resultados obtenidos demuestran que la sobreexpresión del dominio UEV de Vps23 restaura la ubiquitilación de Rim8 en un mutante $\Delta vps23$ (Figura R-14 carril 2). En este caso, el residuo ubiquitilado sigue siendo K521 ya que no se restaura la ubiquitilación de un mutante Rim8-K521R (Figura R-14, carril 3).

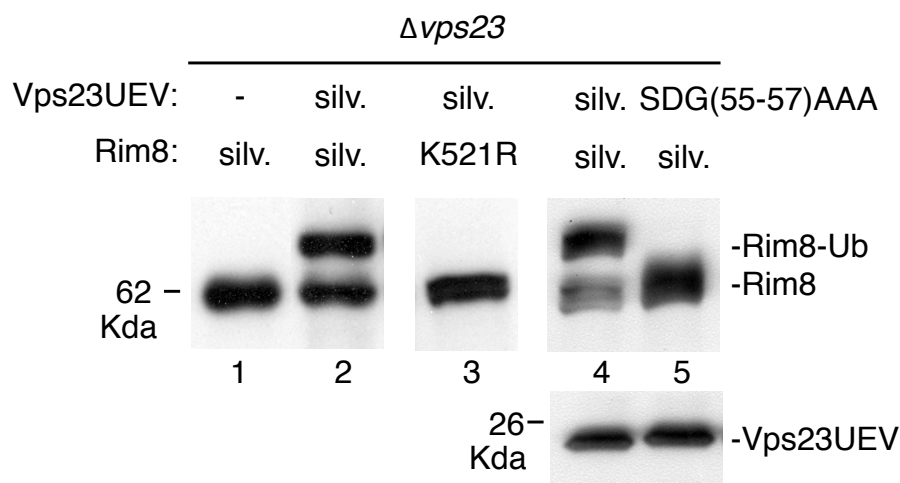


Figura R-14: **La sobreexpresión de Vps23 UEV en un mutante $\Delta vps23$ restaura la ubiquitilación de Rim8.** La cepa Y03416 ($\Delta vps23$) fue cotransformada con los plásmidos pADH1-HA-Vps23UEV (silvestre), el derivado mutante indicado o el plásmido control pWS93 (-), además del plásmido pHARim8 (silvestre) o su derivado mutante con la sustitución K521R. Se realizaron extractos proteicos y se analizaron por inmunoblot con anticuerpos α -HA para detectar HA-Rim8 (panel superior) y Vps23UEV-HA (panel inferior, se muestra únicamente en los carriles 4 y 5). "silv."-silvestre.

Sorprendentemente, el nivel de Rim8 monoubicuitilado no solo se recupera, sino que se incrementa hasta el 50% de la proteína total. Este hecho sugiere que la unión de Vps23UEV a Rim8 promueve la ubiquitilación de Rim8. Ya que el dominio UEV se une tanto a ubiquitina como al motivo SXP, hemos analizado la contribución de cada interacción a este fenómeno. Primero hemos generado un derivado mutante del dominio UEV de Vps23 incapaz de unirse a ubiquitina, pero todavía competente para interaccionar con el motivo SDP de Rim8. Para ello, nos hemos basado en un análisis estructural del dominio UEV de Vps23 acoplado con ubiquitina. Este mostró que existe una secuencia de aminoácidos específica (codones 52 a 57) responsable del reconocimiento de ubiquitina [185]. En un primer paso, analizamos el efecto de la sustitución por residuos de alanina de los tres últimos residuos de esta secuencia [SGD(55-57)/AAA] sobre la interacción en el sistema de doble-híbrido de Vps23 con ubiquitina por una parte y con el motivo SXP por otra. Los resultados obtenidos indican que esta sustitución en Vps23 bloquea su interacción con ubiquitina ya que no permite la interacción con el mutante Rim8-P536L en condiciones en las que se sobreexpresa ubiquitina (Figura R-9). Por otro lado, la sustitución SDG(55-57)/AAA no afecta a la interacción de Vps23 con el motivo SXP en Rim8 (Figura R-1). Además, la sobreexpresión del mutante SDG(55-57)/AAA de Vps23UEV no restaura la ubiquitilación de Rim8 en una cepa $\Delta vps23$ (Figura R-14), lo que indica que la ubiquitilación de Rim8 es estrictamente dependiente de la capacidad del dominio UEV de unir ubiquitina. Para comprobar si la unión del dominio UEV de Vps23 al otro determinante que rige su interacción con Rim8, el motivo SXP, es también necesaria para la ubiquitilación de Rim8, hemos inactivado este motivo mediante la substitución ESDP(533-536)/AAAA en Rim8. Los resultados obtenidos indican que esta substitución provoca la pérdida de la ubiquitilación de Rim8 tanto en condiciones en las cuales se sobreexpresa el dominio UEV de Vps23 como en una cepa silvestre (Figura R-15, carriles 4 y 6). Por el contrario, todavía fue

Resultados

posible detectar una ubiquitilación residual en el residuo K521 en el mutante Rim8-P536L (Figura R-15 comparar carriles 2 y 3), lo que es coherente con lo que se podía inferir de los resultados anteriores, en los que el mutante Rim8-P536L todavía mantenía una unión residual con Vps23.

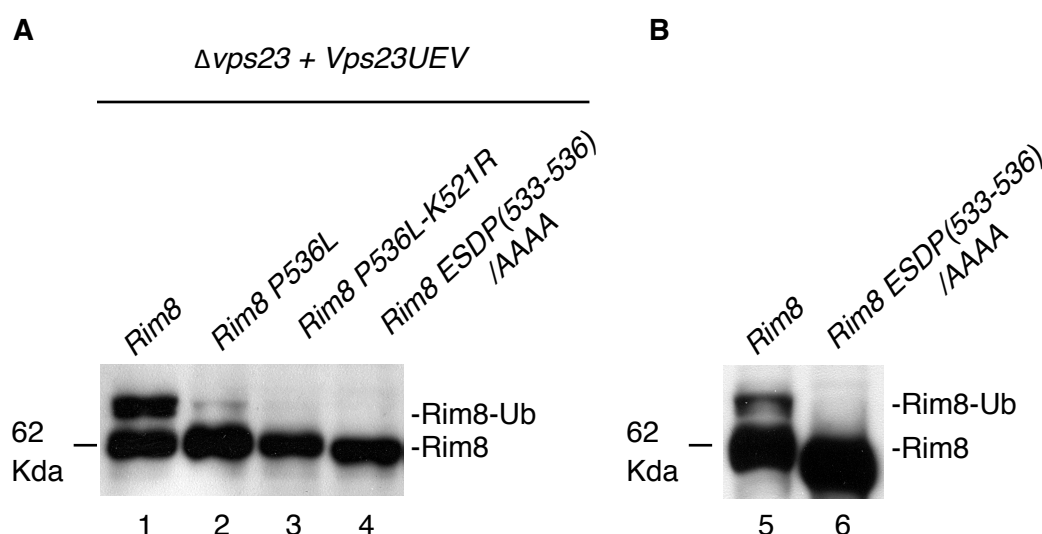


Figura R-15: **La ubiquitilación de Rim8 en K521 es dependiente de la integridad del motivo SXP de unión a Vps23.** (A) La cepa Y03416 ($\Delta vps23$) fue cotransformada con los plásmidos pADH1-HA-Vps23UEV y pHA-Rim8 (silvestre o los derivados mutantes indicados). Se realizaron extractos proteicos y se analizaron por inmunoblot con anticuerpos α -HA para detectar HA-Rim8. (B) La cepa Y04414 ($\Delta rim8$) fue transformada con el plásmido pHA-Rim8 o su derivado mutante que contiene la sustitución ESDP(533-536)/AAAA. Se realizaron extractos proteicos y se analizaron por inmunoblot con anticuerpos α -HA para detectar HA-Rim8.

En conjunto, estos descubrimientos indican que la unión del dominio UEV de Vps23 a Rim8 propicia su ubiquitilación por un mecanismo en el que está implicada la unión de este dominio tanto a ubiquitina como al motivo SXP de Rim8.

El dominio UEV de Vps23 incrementa la monoubiquitilación de Rim8 porque impide que se poliubiquitile.

Los datos que hasta ahora hemos expuesto muestran que, *in vivo*, la monoubiquitilación de Rim8 por la E3 ubiquitina ligasa Rsp5 se potencia cuando se sobreexpresa el dominio UEV de Vps23, que une ubiquitina. Sin embargo, en este contexto es muy difícil obtener datos que aclararan la naturaleza molecular de este fenómeno. Para aclarar los detalles de este mecanismo, hemos puesto a punto un sistema de ubiquitilación *in vitro* con proteínas purificadas. De este modo podemos simplificar el problema y trabajar en condiciones controladas; el objetivo era analizar el efecto del dominio UEV de Vps23 sobre la ubiquitilación de Rim8 por Rsp5.

La reacción de ubiquitilación requiere, además de una proteína sustrato, ubiquitina y ATP, tres enzimas que actúan de forma secuencial: E1, E2, E3 (Uba1, Ubc4 y Rsp5 respectivamente en nuestro caso). La elección de la E1 no suponía un problema, ya que Uba1 es la única E1 de *S. cerevisiae*. Esta enzima y la ubiquitina, las adquirimos de una casa comercial. Para elegir la E2, tuvimos en cuenta que la identidad de esta enzima no

afecta a la especificidad de las reacciones de ubiquitilación catalizadas por Rsp5 [85]. Así, optamos por la E2 Ubc4 ya que funciona conjuntamente con Rsp5 en ensayos de ubiquitilación *in vitro* similares a los que íbamos a realizar [85]. Ubc4 y Rsp5 no estaban disponibles de forma comercial así que las obtuvimos expresándolas en bacterias como proteínas de fusión a un epítipo hexahistidina y las purificamos por afinidad con una resina de cobalto. Para liberarlas de la resina, las eluimos con imidazol y, posteriormente, eliminamos el imidazol mediante diálisis. Además, como era de nuestro interés el estudiar los efectos de la adición del dominio UEV de Vps23 a las reacciones de ubiquitilación *in vitro*, seguimos el mismo abordaje y purificamos una fusión al epítipo hexahistidina de esta proteína y, como control, de la proteína Mms2 (cuya secuencia al completo comprende también un dominio UEV). Para generar la proteína sustrato, expresamos una fusión de GST a Rim8 en bacterias y la purificamos por afinidad con resina acoplada a glutatión. Para detectar nuestra proteína, introducimos una secuencia (RRASV) de reconocimiento por la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) situada inmediatamente después de la secuencia de la GST, que nos permite marcarla con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (Figura R-16A). Sobre esta proteína de fusión marcada e inmovilizada en perlas de glutatión sefarosa, realizamos las reacciones de ubiquitilación. Al terminar la reacción utilizamos una proteasa comercial cuyo sitio de reconocimiento esta inmediatamente antes del sitio de marcaje (Figura R-16A). El corte por esta proteasa nos permite liberar la secuencia correspondiente a Rim8 marcada con radioactividad. Así, podemos estudiar únicamente el producto ubiquitilado correspondiente a Rim8, sin que nuestro análisis se vea dificultado por la ubiquitilación de los residuos de lisina presentes en la secuencia de la GST, que también son susceptibles de ser ubiquitilados *in vitro*.

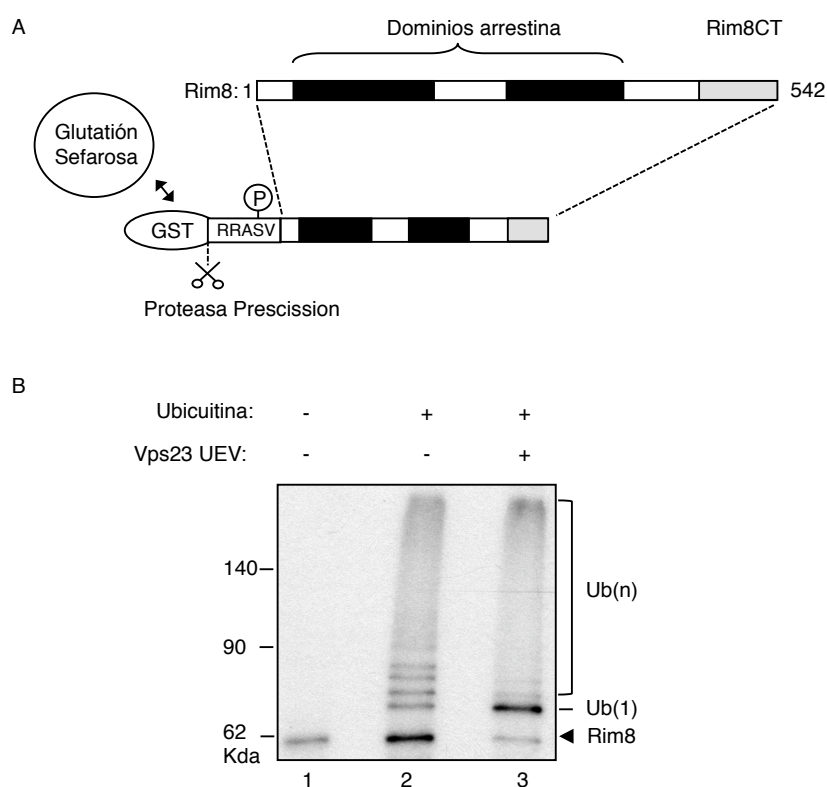


Figura R-16: El dominio UEV de Vps23 favorece la monoubiquitilación de Rim8. (A) Diseño del sustrato utilizado en las reacciones de ubiquitilación *in vitro*. (B) Una fusión GST-Rim8 inmovilizada en perlas de glutatión-sefarosa fue marcada con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y sometida a una reacción de ubiquitilación *in vitro* durante 120 minutos en ausencia o presencia (20 $\mu\text{g/ml}$) del dominio UEV de Vps23 purificado. Posteriormente se eliminó la GST por corte proteolítico y las especies generadas se resolvieron en geles de SDS-poliacrilamida al 7%. Los geles fueron secados y revelados por autorradiografía. En el carril 1 se muestra un 10% de la mezcla de reacción a la que no se le ha añadido ATP.

Resultados

En la Figura R-16B, (carril 2), se muestra el resultado del primer ensayo de ubiquitilación *in vitro*. Se observa como Rim8 es ubiquitilado eficazmente por Rsp5 *in vitro*, lo que demuestra que el sistema de ubiquitilación *in vitro* funciona de forma eficiente. Notablemente, y en consonancia con los datos obtenidos *in vivo*, los niveles de Rim8 monoubicuitilado se incrementan significativamente cuando se añade el dominio UEV de Vps23 purificado (Figura R-16B, carril 3).

Rim8 contiene dos dominios arrestina y una región C-terminal (Rim8CT) que incluye el residuo ubiquitilado *in vivo* (K521) y el motivo PKY de interacción con Rsp5 (Figura R-17A).

Para comprender los detalles del efecto del dominio UEV de Vps23 sobre la ubiquitilación de Rim8 y ya que *in vitro* la ubiquitilación en múltiples residuos puede causar dificultades en el análisis de los productos de la reacción, generamos un sustrato que contiene solo el residuo de lisina que nos interesa estudiar. Este sustrato consiste en el fragmento C-terminal de Rim8 [Rm8CT(1K)] con sustituciones de residuos de lisina por residuos de arginina, que dejan solamente el residuo K521 intacto (Figura R-17A). Por otra parte, la posible ubiquitilación del grupo amino terminal del sustrato [85], queda descartada ya que los ensayos de ubiquitilación se llevaron a cabo con una fusión de GST a Rim8CT(1K) de la que posteriormente se eliminó la GST por corte proteolítico (Figura R-17A).

Mediante este abordaje experimental, observamos que Rim8CT(1K) se poliubiquitila *in vitro* únicamente en el residuo K521 ya que no se observaron productos ubiquitilados con el derivado mutante Rim8CT(OK), portador de la sustitución K521R (Figura R-17B). Por otra parte, y de acuerdo con nuestros datos previos *in vivo* la ubiquitilación *in vitro* tampoco se observó con el mutante Rim8CT(1K) Δ PKY, en el que el motivo PKY de interacción con la ubiquitina ligasa Rsp5 se sustituyó por residuos de alanina (Figura R-17B).

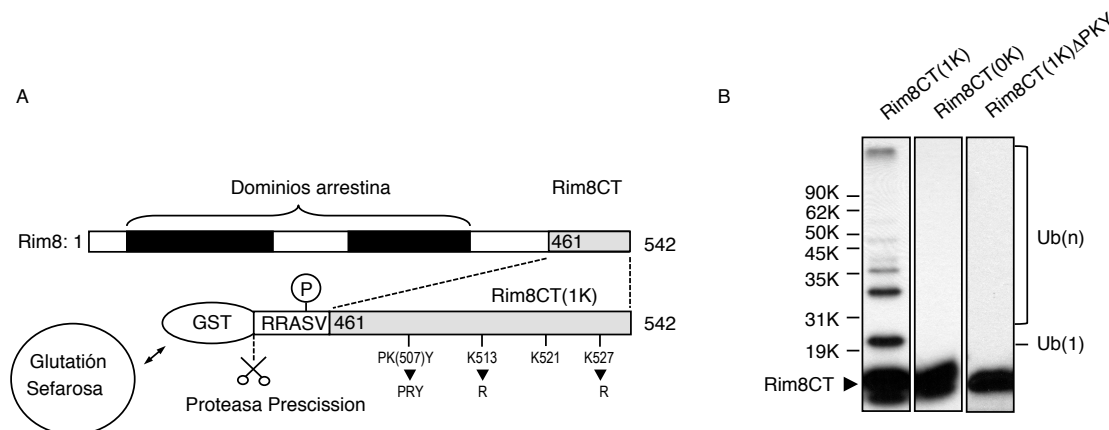


Figura R-17: Ubiquitilación *in vitro* de Rim8CT(1K) dependiente del residuo K521 y del motivo PKY.

(A) Diseño del sustrato Rim8CT(1K), se muestran los residuos de lisina eliminados. (B) Las fusiones a GST de Rim8CT(1K) y a sus derivados mutantes Rim8CT(OK) y Rim8CT(1K) Δ PKY se usaron como sustratos en reacciones de ubiquitilación *in vitro* durante 90 min. Posteriormente se eliminó la GST por corte proteolítico y las especies generadas se resolvieron en geles de SDS-acrilamida al 12%. Los geles fueron secados y revelados por autoradiografía.

Una vez el sustrato validado, procedimos a caracterizar el efecto del dominio UEV de Vps23 sobre la reacción de ubiquitilación. De acuerdo con los datos obtenidos con la proteína entera, observamos que al añadir el dominio UEV de Vps23 al sustrato Rim8CT(1K), se inhibe la formación de especies poliubiquitiladas, y se genera un sustrato conjugado con una sola ubiquitina (Figura R-18). Este efecto se observa solo cuando la cantidad de Vps23UEV supera un umbral determinado.

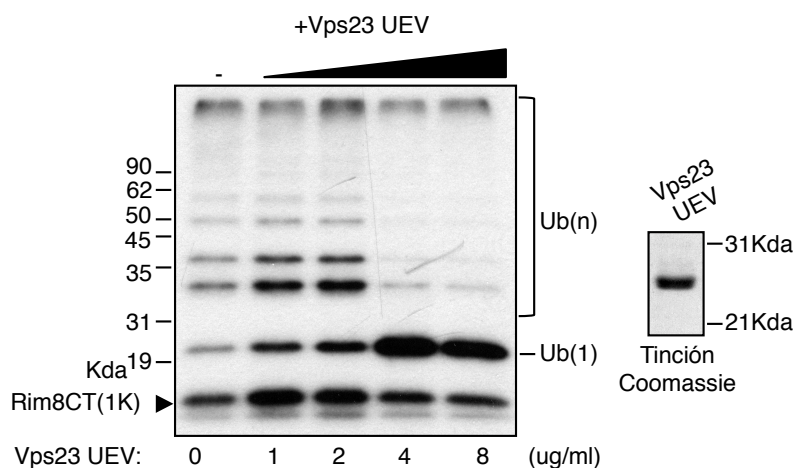


Figura R-18: **El dominio UEV de Vps23 impide que Rim8CT(1K) se poliubiquitile *in vitro*.** La fusión a GST de Rim8CT(1K) se usó como sustrato en reacciones de ubiquitilación *in vitro* durante 120 min en presencia de cantidades crecientes del dominio UEV de Vps23. Posteriormente se eliminó la GST por corte proteolítico y las especies generadas se resolvieron en geles de SDS-poliacrilamida al 12%. Los geles fueron secados y revelados por autoradiografía. Se indica la concentración de Vps23UEV añadida en cada caso y se muestra por tinción de Coomassie una cantidad representativa del dominio UEV purificado (775 ng).

Para determinar si este efecto es específico, repetimos el experimento sustituyendo el dominio UEV de Vps23 por Mms2, la segunda proteína con dominio UEV en *S. cerevisiae*, implicada en la formación de cadena de ubiquitina en K63 [42]. No se observó un incremento en la monoubiquitilación de Rim8CT(1K) con cantidades equivalentes o mayores de la proteína Mms2 (Figura R-19), lo que indica que este efecto no se debe simplemente a la presencia de un dominio de unión a ubiquitina (UBD) en la mezcla de reacción.

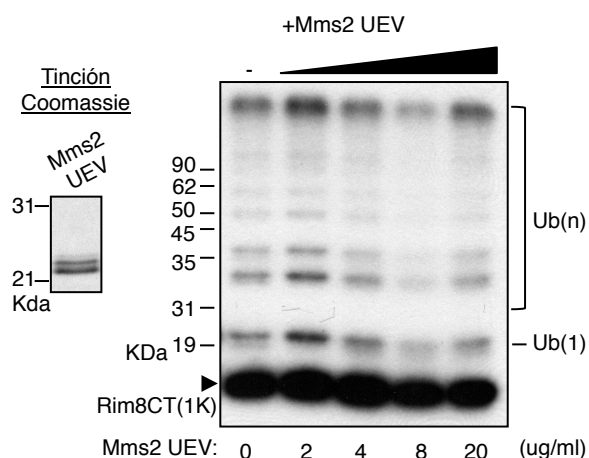


Figura R-19: **La proteína con dominio UEV, Mms2, no tiene efecto alguno sobre la poliubiquitilación *in vitro* de Rim8CT(1K).** La fusión a GST de Rim8CT(1K) se usó como sustrato en reacciones de ubiquitilación *in vitro* durante 120 min en presencia de cantidades crecientes de Mms2. Posteriormente, se eliminó la GST por corte proteolítico y las especies generadas se resolvieron en geles de SDS-acrilamida al 12%. Los geles fueron secados y revelados por autoradiografía. Se indica la concentración de Mms2 (UEV) añadida en cada caso y se muestra por tinción de Coomassie una cantidad representativa del dominio purificado (775 ng).

Resultados

Este era un control importante porque podría suponerse que los efectos observados se debieran al secuestro de la ubiquitina por parte de cualquier UBD presente en la mezcla de reacción.

Llegados a este punto, pensamos que era posible que el efecto del dominio UEV de Vps23 en la ubiquitilación de Rim8CT(1K) se debiera únicamente a la inhibición de la extensión de las cadenas de ubiquitina o, también a una tasa incrementada del inicio de la reacción de ubiquitilación. Para descartar esta segunda posibilidad, repetimos el experimento con una ubiquitina sin residuos de lisina (KO), que no puede formar cadenas de ubiquitina. En estas condiciones, incluso una cantidad mayor de Vps23UEV (8ug/ml) no tuvo ningún efecto en la monoubiquitilación de Rim8 (Figura R-20), lo que indica que el dominio UEV de Vps23 no afecta a la conjugación de la primera ubiquitina y que su único efecto consiste en impedir que las cadenas de ubiquitina se extiendan.

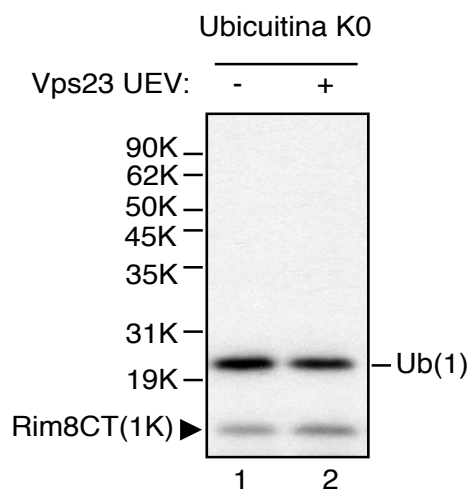
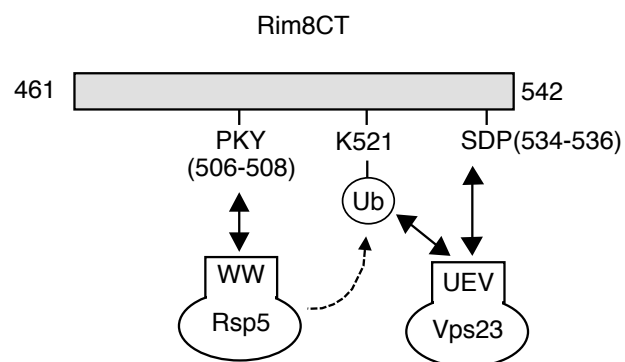


Figura R-20: El dominio UEV de Vps23 no afecta a la conjugación de la primera ubiquitina a RimCT(1K). La fusión a GST de Rim8CT(1K) se usó como sustrato en reacciones de ubiquitilación *in vitro* durante 45 min en presencia de ubiquitina sin residuos de lisina (UbK0) y en presencia o ausencia del dominio UEV de Vps23 (8 µg/ml). Posteriormente se eliminó la GST por corte proteolítico y las especies generadas se resolvieron en geles de SDS-poliacrilamida al 12%. Los geles fueron secados y revelados por autoradiografía.

La interacción del dominio UEV de Vps23 tanto con ubiquitina como con el motivo SXP de Rim8 es necesaria para la inhibición de la poliubiquitilación del residuo K521 de Rim8.

Los resultados expuestos en el primer apartado de la tesis indican que el residuo monoubiquitilado de Rim8 contribuye, junto con el motivo SXP, a la unión al dominio UEV de Vps23 (Figuras R-1 y R-9. Esquemático en Figura R-21).

Figura R-21: Representación esquemática de las interacciones de Rim8 con Rsp5 (dominios WW) y con Vps23 (dominio UEV). Se indican con flechas las interacciones entre los motivos PKY, SDP y el residuo de lisina ubiquitilado en la región C-terminal de Rim8 (Rim8CT) y los dominios WW y UEV de Rsp5 y Vps23. Además, con flecha discontinua se indica la reacción de ubiquitilación catalizada por Rsp5.



Para analizar la contribución específica de cada determinante en la interacción con el dominio UEV de Vps23, llevamos a cabo un experimento de unión *in vitro* usando como cebo GST-Vps23UEV y, como presas, los sustratos, previamente ubiquitilados *in vitro*, Rim8CT(1K) y su derivado mutante Rim8CT(1K) Δ SDP en el que el motivo SXP ha sido sustituido por residuos de alanina (Figura R-22). Este abordaje nos aporta con respecto a los ensayos realizados previamente con extractos celulares (Figura R-11) la posibilidad de estudiar la unión del dominio UEV de Vps23 mediada exclusivamente por el residuo ubiquitilado de Rim8. Esto es posible usando el mutante Rim8CT(1K) Δ SDP previamente ubiquitilado *in vitro*; recordemos que *in vivo*, al eliminar el motivo SXP dejaba de observarse Rim8 ubiquitilado haciendo imposible estudiar cada elemento por separado. Para detectar únicamente las interacciones más fuertes, hemos utilizado condiciones más restrictivas (2% Triton).

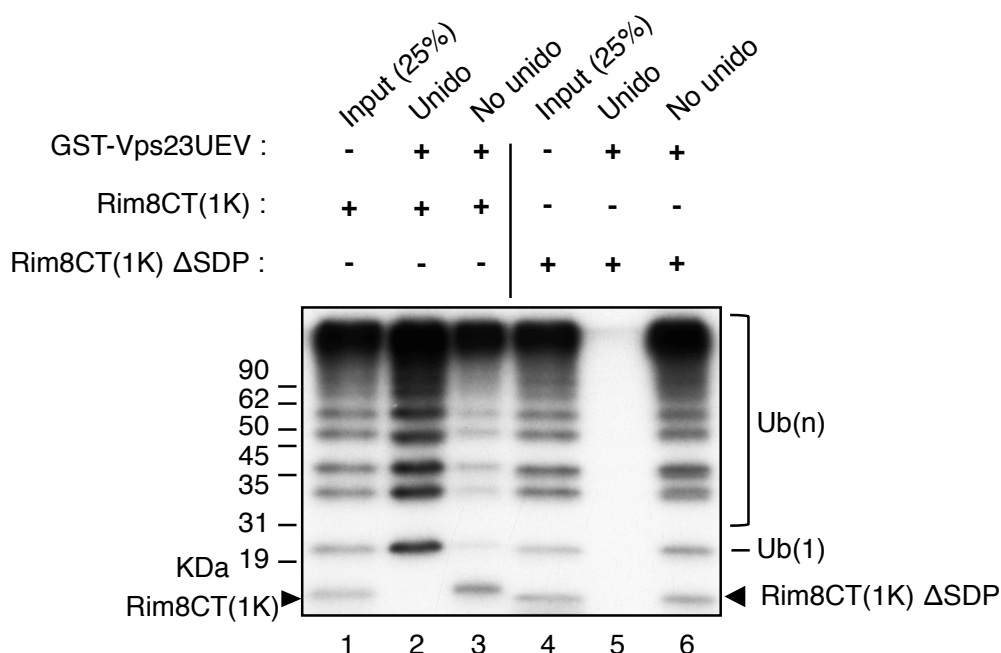


Figura R-22: La unión conjunta del dominio UEV de Vps23 con el residuo ubiquitilado y con el motivo SXP en Rim8CT es necesaria para la formación de un complejo estable. Ensayo de interacción *in vitro* entre Vps23UEV y Rim8CT(1K) o su derivado mutante Rim8CT(1K) Δ SDP. Las fusiones de Rim8CT a GST se utilizaron como sustrato en reacciones de ubiquitilación *in vitro*. Tras eliminar la GST por corte proteolítico, los fragmentos liberados fueron incubados con una fusión de GST al dominio UEV de Vps23. Las especies unidas se separaron en geles de SDS-poliacrilamida al 12% que se resolvieron por autoradiografía. El "input" corresponde a una fracción de la proteína ubiquitilada que luego se usó en el ensayo de unión. Se realizó el experimento de interacción en presencia de 2% Tritón, para detectar solo los complejos más estable.

En estas condiciones la unión por separado del dominio UEV de Vps23 a ubiquitina o al motivo SXP no es suficiente para producir un complejo estable ya que ni la forma no ubiquitilada de Rim8CT(1K) ni la forma ubiquitilada de Rim8CT(1K) Δ SDP se detectan en el ensayo de unión *in vitro* (Figura R-22, carriles 2 y 5). Por el contrario, se detecta una fuerte interacción entre Vps23 UEV y las formas mono o poliubiquitiladas de Rim8CT(1K) (Figura R-22, carril 2), lo que indica que la unión simultánea de Vps23UEV al residuo monoubiquitilado y al motivo SXP es necesaria para producir un complejo estable.

Resultados

Seguidamente analizamos si estas dos interacciones son también necesarias para el bloqueo de la poliubiquitilación de Rim8 por parte del dominio UEV de Vps23 *in vitro*. En la Figura R-23 se muestra una cinética de ubiquitilación de Rim8CT(1K) y Rim8CT(1K) Δ SDP en 3 condiciones: sin Vps23UEV, con Vps23UEV o con un derivado mutante, Vps23UEV Δ SDG, que porta la sustitución SDG(55-57)AAA [185] que, como hemos demostrado anteriormente, impide la unión a ubiquitina pero no afecta a la unión al motivo SXP (Figura R1 y R9).

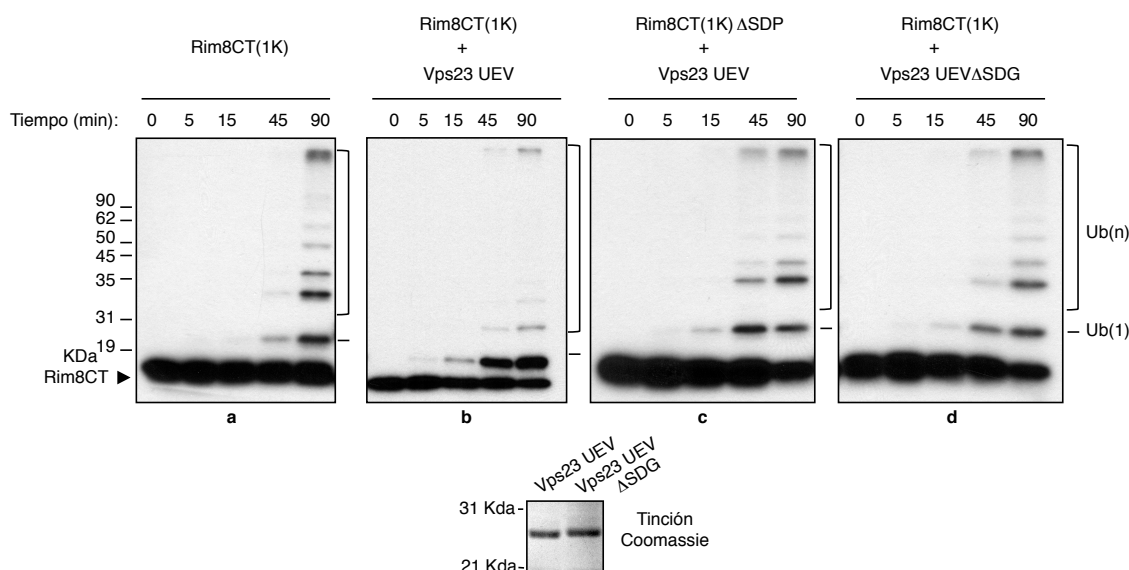


Figura R-23: El bloqueo de la poliubiquitilación de Rim8CT(1K) por parte del dominio UEV de Vps23 depende tanto de la integridad del motivo SXP como de la capacidad de este dominio de unir ubiquitina. Se muestra una cinética de ubiquitilación *in vitro* en la que se usaron como sustratos las fusiones a GST de Rim8CT(1K) y de su derivado mutante Rim8CT(1K) Δ SDP. Estas reacciones se realizaron, según se indica, en presencia o en ausencia de cantidades constantes (8 μ g/ml) de Vps23UEV o de su derivado mutante Vps23UEV Δ SDG, que no une ubiquitina. Posteriormente se eliminó la GST por corte proteolítico y las especies generadas se resolvieron en geles de SDS-poliacrilamida al 12%. Los geles fueron secados y revelados por autoradiografía. Se muestra, además, por tinción de Coomassie una fracción representativa de las especies de Vps23UEV añadidas a las mezclas de reacción (775 ng).

La inhibición de la poliubiquitilación de Rim8 es estrictamente dependiente de la unión del dominio UEV de Vps23 tanto a ubiquitina como al motivo SXP, ya que con la proteínas mutantes Rim8CT(1K) Δ SDP o Vps23UEV Δ SDG (Figura R-23, paneles C y D) ya no se observó la acumulación de Rim8CT(1K) monoubiquitilado (Figura R-23, comparar paneles B y A). Estos resultados son coherentes con los obtenidos anteriormente *in vivo*. En ellos se mostraba que el incremento en la monoubiquitilación de Rim8 obtenido al sobreexpresar el dominio UEV de Vps23, requiere que este último se una tanto a ubiquitina (Figura R-14, carril 5) como al motivo SXP (Figura R-15 carril 4). Junto con los datos de unión *in vitro*, estos hallazgos apoyan la idea de que la unión del dominio UEV tanto al motivo SXP como al residuo monoubiquitilado impide la elongación de la cadena de ubiquitina por parte de Rsp5.

Estudios previos han demostrado que la ubiquitilación es menos selectiva *in vitro* que *in vivo* y que residuos no ubiquitilados *in vivo* pueden serlo *in vitro*. Utilizamos esta propiedad para determinar si la localización del residuo de lisina en Rim8 es importante para que el dominio UEV de Vps23 tenga el efecto descrito.

Dado que el residuo K521 de Rim8 es el único sitio para el cual detectamos ubiquitilación *in vivo*, hemos comprobado si el dominio UEV de Vps23 tenía algún efecto sobre la ubiquitilación *in vitro* de otros residuos de lisina. Para ello, utilizamos en ensayos de ubiquitilación *in vitro* un fragmento C-terminal de Rim8 (Rim8CT(3K)) que carece del residuo K521 pero contiene los otros tres residuos de lisina presentes en esta región de la proteína (ver esquema de la figura R17A). Con este sustrato, observamos la ubiquitilación *in vitro* de los otros residuos de lisina (Figura R-24, carril 3), si bien es cierto que a niveles menores que los detectados en el residuo K521 (Figura R-24, carril 1). Sin embargo, la ubiquitilación de este sustrato es insensible a la adición del dominio UEV de Vps23 (Figura R-24, comparar carriles 3 y 4).

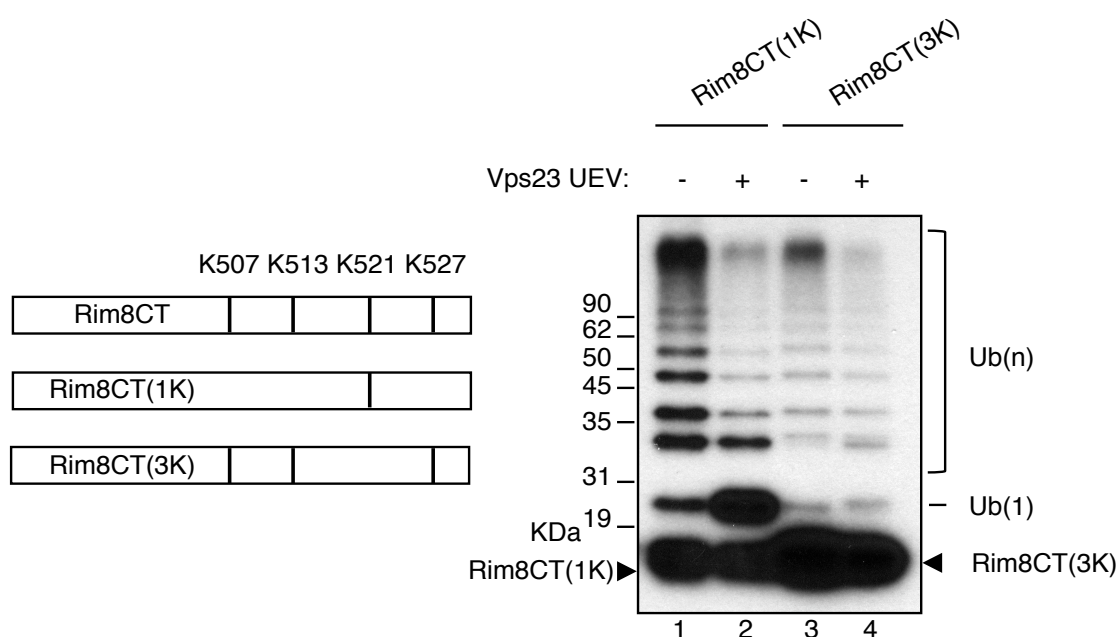


Figura R-24: **El efecto del dominio UEV de Vps23 sobre la ubiquitilación de Rim8CT es específico del residuo K521.** A la izquierda se muestra una representación esquemática de los residuos de lisina presentes en cada especie de Rim8CT generada. A la derecha se muestran los productos generados en un ensayo de ubiquitilación *in vitro* (90min) en el que se usó como sustrato Rim8CT(1K) o Rim8CT(3K). Estas reacciones se realizaron en presencia o ausencia de 16 µg/ml de Vps23 UEV.

Esta observación sugiere que el efecto inhibitorio observado sobre la poliubiquitilación del residuo K521 (Figura R-24, comparar carriles 1 y 2) es estrictamente dependiente de la localización precisa de ese residuo de lisina.

***In vivo*, Vps23 impide que Rim8 se poliubiquitile porque bloquea la formación de cadenas de ubiquitina enlazadas en K63.**

Los datos obtenidos en el primer apartado de esta tesis muestran que, *in vivo*, no se detecta Rim8 monoubiquitilado en extractos de un mutante $\Delta vps23$ (Figura R-13). Tomando en cuenta los resultados obtenidos *in vitro*, es probable que en ausencia de Vps23, Rim8 se poliubiquitile, provocando su posible

Resultados

degradación. Si se toma esta asunción como válida, se puede predecir que al inhibir la formación de cadenas de ubiquitina en un mutante $\Delta vps23$, se deberían restaurar los niveles normales de Rim8 monoubicuitilado. Por el hecho de que Rsp5 cataliza preferencialmente la formación de cadenas de ubiquitina enlazadas en K63 [51, 84], examinamos la monoubicuitilación de Rim8 en un mutante $\Delta vps23$ cuya única fuente de ubiquitina es una ubiquitina con la sustitución K63R. En la Figura R-25 se muestra que la expresión de la ubiquitina mutante K63R en una cepa $\Delta vps23$ restaura la monoubicuitilación de Rim8 hasta niveles cercanos a los detectados en la cepa silvestre (comparar los carriles 4 y 1).

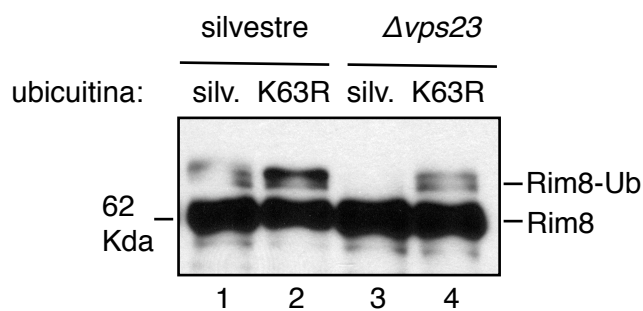


Figura R-25: **Vps23 impide que Rim8 se poliubiquitile *in vivo*.** Las cepas SUB280 (silvestre), SUB413 (UbK63R) y las cepas derivadas SUB280- $vps23\Delta$ y SUB413- $vps23\Delta$ fueron transformadas con pHA-Rim8. Se realizó un cultivo a partir del cual se preparó un extracto proteico que fue analizado por inmunoblot con anticuerpo α -HA para detectar Rim8. "silv": silvestre.

Estos resultados indican que la no detección de Rim8 monoubicuitilado en un mutante $\Delta vps23$ se debe a su poliubiquitilación mediante enlaces en K63, lo que está apoyado por los datos *in vitro* que indican que el dominio UEV impide la poliubiquitilación de Rim8.

Bloque 3: Localización subcelular de Rim8.

Colocalización en la membrana plasmática de Rim8 y Vps23 sobreexpresados.

Estudios previos muestran que Vps23 se localiza en compartimentos endosomales y que esta localización se pierde en ausencia de Vps27 [83, 82]. Como Rim8 parece sustituir a Vps27 en el reclutamiento de ESCRT-I vía su interacción con Vps23, analizamos si la sobreexpresión de Rim8 redirige Vps23 a algún otro compartimento. Para ello, estudiamos la localización de Vps23 etiquetado con mCherry sobreexpresado solo o conjuntamente con Rim8 etiquetado con GFP. Cada proteína de fusión se expresó desde su propio promotor en un plásmido de 2 μ de alto número de copias. Como se había observado anteriormente [83] y consistentemente con su distribución endosomal, Vps23-mCherry se localiza en el citoplasma y en estructuras punteadas internas en ausencia de Rim8-GFP (Figura R-26). La co-sobreexpresión con Rim8-GFP, sin embargo, resulta en el reclutamiento de Vps23-GFP a estructuras punteadas periféricas donde colocaliza con Rim8-GFP (Figura R-26).

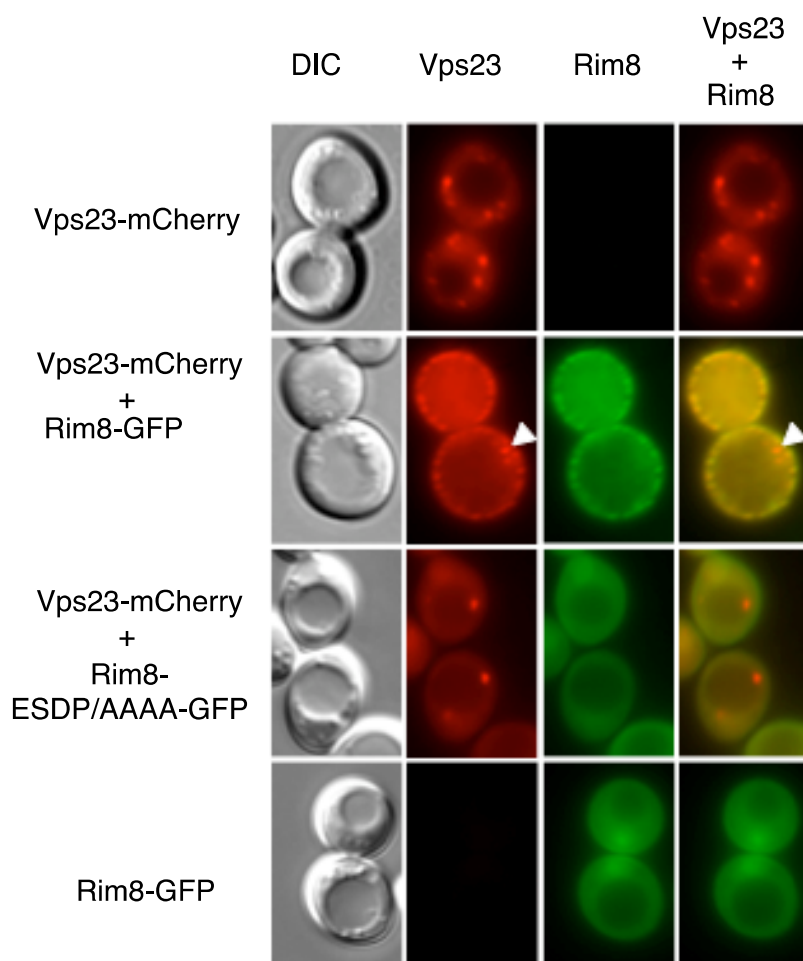


Figura R-26: Cuando se sobreexpresan a la vez, Vps23 y Rim8 colocalizan en la membrana plasmática de manera dependiente de su interacción. La cepa W303 (silvestre) se cotransformó con los plásmidos pVps23-mCherry o con el vector vacío pRS424, además de con pRim8-GFP, con un derivado mutante con la substitución ESDP(533-536)/AAAA o con el vector vacío pRS423, como se indica a la izquierda de la figura. Las células se cultivaron en medio mínimo hasta que alcanzaron la fase logarítmica. La localización subcelular de las proteínas marcadas se examinó por microscopía de fluorescencia y de contraste de interferencia diferencial (DIC). Las flechas blancas indican puntos internos de Vps23-mCherry que no coinciden con los de Rim8-GFP.

Señaladamente, en estas condiciones, todavía se pueden observar algunos focos internos de Vps23-mCherry que no coincidían con los de Rim8-GFP (Figura R-26, flecha blanca). La relocalización de Vps23-mCherry a la membrana plasmática no se observa cuando Vps23 se cosobreexpresa junto con la proteína mutante Rim8-ESDP(533-536)/AAA-GFP, incapaz de unirse a Vps23 (Figura R-26). Bajo estas condiciones, al igual que en ausencia de Vps23 sobreexpresado, la localización de Rim8-GFP es difusa en el citoplasma, y un

Resultados

poco enriquecida en el núcleo. En conjunto, estos resultados indican que la colocalización de Rim8 y Vps23 en estructuras punteadas periféricas es estrictamente dependiente de la interacción entre estas dos proteínas. Además, y aunque haya que tener en cuenta posibles artefactos derivados de la sobreexpresión de estas proteínas, estos datos sugieren que estas proteínas al interactuar, se localizan en focos en la membrana plasmática.

La localización de Rim8 depende del pH y coincide con la de Rim21.

En el modelo actual de la ruta *RIM*, Rim21, uno de los dos putativos sensores de pH, se localiza en la membrana plasmática. Como Rim8 interactúa con Rim21 en el sistema de doble-híbrido, hemos querido determinar si Rim8 colocaliza con Rim21 en la membrana plasmática. La expresión de Rim8 es demasiado baja como para detectarla cuando se fusiona a una sola GFP y solo se puede detectar una vez sobreexpresada. Sin embargo, utilizando una nueva herramienta, una fusión funcional de Rim8 a 3XGFP, conseguimos detectarlo (Figura R-27). Con esta nueva herramienta, lo primero que quisimos determinar era si la localización de Rim8 varía en función del pH ambiental, determinante para la activación de la ruta *RIM*. Así, hemos advertido que la localización de Rim8-3XGFP es dependiente del pH ambiental. Rim8 se localiza en focos periféricos (1 o 2 por célula) cuando el pH se incrementa de 6 a 8, lo que concuerda con observación previas [106]. Por el contrario, observamos que estos puntos no se detectan cuando el pH ambiental se rebaja de 6 a 4 (Figura R-27).

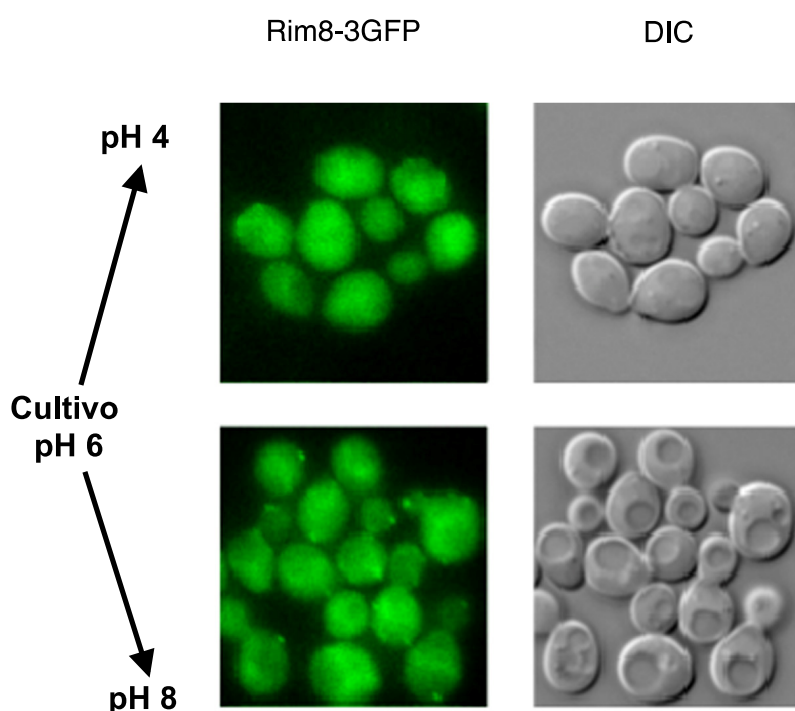


Figura R-27: Rim8 se localiza en focos periféricos en respuesta a un incremento del pH ambiental. La cepa OY172, que expresa Rim8-3xGFP desde su propio locus genómico, se cultivó hasta fase logarítmica en YAPD (pH final 6). Posteriormente las células se cambiaron a un medio mínimo ajustado a pH4 o a pH8. Inmediatamente después, se observó la localización de Rim8-3xGFP por microscopía de fluorescencia y de contraste de interferencia diferencial (DIC).

Seguidamente nos interesamos por la localización subcelular de Rim21. Lamentablemente, los niveles de expresión de Rim21 son aún mucho más bajos que los de Rim8 y la fusión de esta proteína con GFP es indetectable. Como abordaje alternativo, construimos una cepa que co-sobreexpresa los diferentes componentes del complejo sensor de pH, Rim21, Dfg16 y Rim9, junto con Rim8. Para evitar posibles artefactos debido a la

sobreexpresión desde plásmidos multicopia, integramos en el genoma construcciones de estas proteínas sin etiquetar o etiquetadas con GFP o mCherry, expresadas bajo el control del promotor fuerte y constitutivo *ADH1*. Previamente se comprobó con plásmidos centroméricos la funcionalidad de cada una de estas construcciones mediante análisis fenotípicos de complementación del fenotipo *rim* en un medio en presencia de Litio. Una vez la cepa construida, analizamos la localización subcelular de Rim8-mCherry y Rim21-GFP sobreexpresadas conjuntamente con Dfg16 y Rim9. En estas condiciones, Rim8-mCherry se localiza en varios puntos periféricos de manera independiente del pH ambiental, lo que sugiere que la sobreexpresión conjunta de los componentes del complejo sensor de pH elimina la regulación por el pH de la localización de Rim8 a la vez que incrementa el número de focos por célula (Figura R-28). Tanto a pH4 como a pH8, los puntos de Rim8-mCherry colocalizan con los focos de Rim21-GFP (Figura R-28).

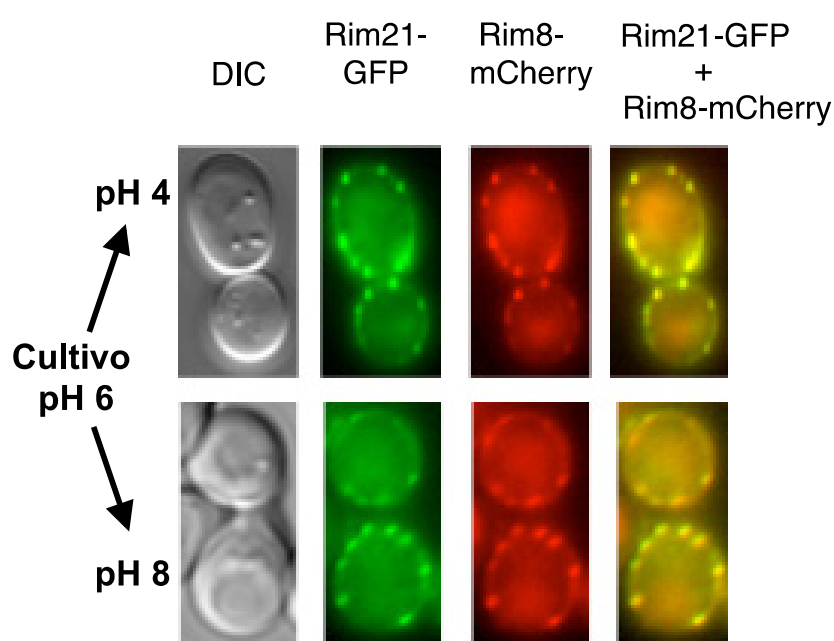


Figura R-28: Cuando se sobreexpresan los distintos componentes del complejo sensor de pH, Rim21 y Rim8 colocalizan en focos en la membrana plasmática. La cepa OVY137, que contiene integrados *RIM8-mCherry*, *RIM21-GFP*, *DFG16* y *RIM9* bajo el control del promotor de *ADH1* se cultivó hasta fase logarítmica en YAPD (pH final 6). Posteriormente, las células se cambiaron a un medio mínimo ajustado a pH4 o a pH8. Inmediatamente después, se observó la localización de Rim8-mCherry y de Rim21-GFP por microscopía de fluorescencia y de contraste de interferencia diferencial (DIC).

Estos resultados en conjunto, apoyan la idea de que Rim21 colocaliza con Rim8 en la membrana plasmática porque la localización de Rim8 no sobreexpresado coincide, cuando se incrementa el pH del medio, con la de Rim8 y Rim21 co-sobreexpresados.

DISCUSIÓN

Discusión

Rim8, un adaptador alternativo a Vps27 para el reclutamiento de ESCRT.

Los complejos ESCRT-I, -II y -III son imprescindibles para la ruta endocítica del cuerpo multivesicular (MVB) así como para la ruta *RIM* de señalización por pH ambiental. La concepción mecanística del funcionamiento de ESCRT, como una cascada en la que los complejos participan de manera secuencial, asume la necesidad de que un iniciador o adaptador, ESCRT-0, “dispare” el reclutamiento de esta maquinaria a las proteínas cargo. Este hecho hacía sorprendente la evidencia de que Vps27 no se requiriera para el funcionamiento de la ruta *RIM* y sugería la posibilidad de que un adaptador alternativo lo sustituyera en este contexto específico. En esta tesis hemos demostrado por diferentes vías experimentales, que la proteína de la familia de las arrestinas Rim8 realiza esta función adaptadora reclutando el complejo ESCRT-I a la proteína 7TM Rim21. Al igual que las β -arrestinas, Rim8 interacciona con una proteína 7TM mediante sus dominios arrestina. Por otro lado, al igual que Vps27, Rim8 se une directamente a la subunidad Vps23 de ESCRT-I. La unión de Vps23 a Rim8 y a Vps27 comparte varias características. En ambos casos es el dominio UEV de Vps23 el encargado de la unión. Dos motivos relacionados son los determinantes específicos reconocidos por Vps23: PSDP en Vps27 y SDP en Rim8. Estos resultados se pueden explicar con un modelo en el que Rim8 actúa como un ESCRT-O específico para las funciones de la ruta *RIM* que recluta la maquinaria ESCRT a la proteína 7TM Rim21 (Figura D-1).

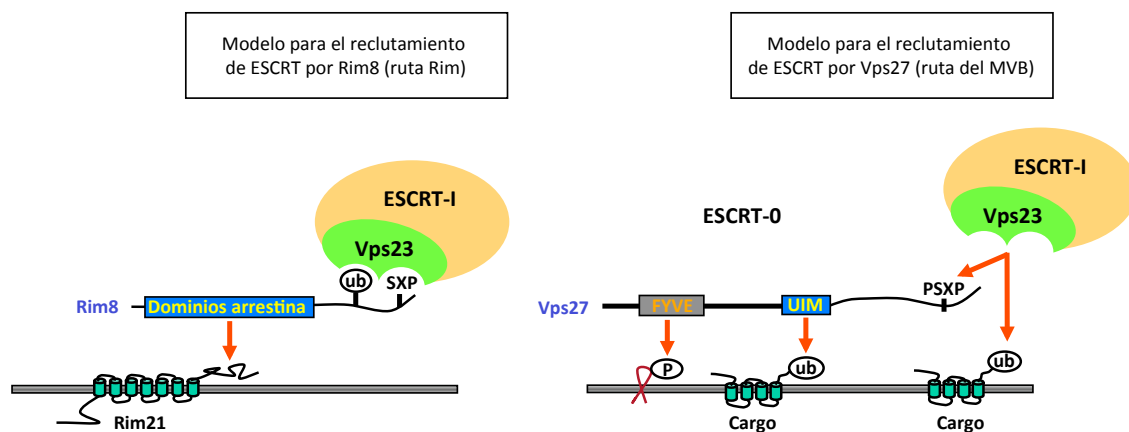


Figura D-1: **Vps27 y Rim8 median el reclutamiento de la maquinaria ESCRT a proteínas endocitadas en el contexto de la ruta del MVB y a la proteína 7TM Rim21 en la ruta *RIM*, respectivamente.** Se muestran los determinantes moleculares de las interacciones entre Vps23 y Rim8 y de este último con Rim21, además de los determinantes responsables del reclutamiento del complejo ESCRT-O y ESCRT-I a una proteína cargo ubiquitinada.

Por otro lado, las funciones clásicas de los ESCRTs no relacionadas con la ruta *RIM*, es decir, tráfico de proteínas ubiquitinadas en el endosoma, serían iniciadas por el adaptador Vps27. Existen, además, datos adicionales que apoyan esta separación de las funciones de la maquinaria ESCRT. Observaciones realizadas en

nuestro laboratorio mediante tinción de las células con el colorante FM4-64, indican que una cepa mutante $\Delta rim8$ no muestra defectos asociados a una disfunción del MVB, lo que además es coherente con estudios previos que demuestran que las proteínas específicas de la ruta *RIM*, Dfg16, Rim21 y Rim101 son prescindibles para el correcto funcionamiento de la ruta del MVB [17]. A la inversa, existen componentes de la maquinaria ESCRT, como Vps2, Vps24 y Bro1 que bloquean la función del MVB pero respetan el procesamiento de Rim101 [204].

Existen otros aspectos que diferencian la función de estos dos adaptadores. Durante el tráfico de proteínas a nivel del endosoma, Vps27 reconoce los cargos ubiquitilados por medio de su dominio UIM, que une ubiquitina. El mecanismo por el que Rim8 reconoce Rim21 es diferente. Rim8, que carece de dominios de unión a ubiquitina conocidos, utiliza sus dominios arrestina para llevar a cabo esta función. Otra diferencia consiste en que el dominio UEV de Vps23 une simultáneamente los motivos PSDP en Vps27 y la ubiquitina conjugada con el cargo (Figura D-1). Se ha propuesto que la pequeña distancia que el cargo tendría que recorrer facilitaría su transición desde ESCRT-O a ESCRT-I [29]. Según nuestros datos, en la interacción con Rim8 los dos determinantes reconocidos por Vps23, el motivo SDP y el residuo monoubiquitilado, son parte de la propia proteína reconocida, lo que sugiere que no hay un cargo que deba transitar entre los ESCRT, sino una proteína, Rim8, que hace las funciones tanto de “cargo” como de ESCRT-O.

Un cuestión importante concierne a las posibilidades de reclutamiento de ESCRT. Hemos demostrado que esta maquinaria puede ser reclutada por, al menos, un adaptador alternativo, Rim8, que lo dirige a una función específica. Hasta ahora no se habían encontrado adaptadores alternativos para ESCRT en levadura y Rim8 no había aparecido como una proteína asociada a ellos. Este hecho, que se podría explicar por la baja cantidad de Rim8 asociada a Vps23 (recuérdese que solo es la fracción ubiquitilada), abre la puerta a que en estudios venideros se identifiquen otros adaptadores que puedan dirigir la función de ESCRT de manera similar en levadura. Fenómenos similares ya se han observado en mamíferos, en procesos tales como la gemación de los retrovirus o la citoquinesis, en los que adaptadores alternativos, proteínas Gag y Cep55 respectivamente, actúan de manera similar a ESCRT-O en el reclutamiento de los complejos ESCRT interaccionando con Tsg101, el homólogo de Vps23 en mamíferos [36, 144]. Además se ha propuesto que, en levadura, proteínas Gga directoras del tráfico Golgi-endosoma puedan también funcionar de manera similar a Vps27 en este proceso [8].

Rim8: Similitudes y diferencias funcionales con otras arrestinas.

Rim8 y las β -arrestinas de mamíferos comparten numerosas similitudes funcionales. Ambas sirven como adaptadores que enlazan proteínas 7TM a maquinarias endocíticas; las β -arrestinas se unen a clatrina y a la proteína adaptadora de clatrina AP2 y Rim8 a Vps23, un componente de la maquinaria ESCRT. Además, la asociación de las arrestinas con la maquinaria ESCRT no está reducida a los hongos. Hay que recordar que la β -arrestina-1 interacciona con STAM-1, una subunidad de ESCRT-O en mamíferos, lo que regula la degradación por el lisosoma del receptor 7TM CXCR4 [113]. Por otro lado, ambas se unen a sus interactores por las mismas regiones; tanto las β -arrestinas como Rim8 unen los receptores mediante sus dominios arrestina y las proteínas endocíticas mediante determinantes situados en su región C-terminal.

La unión con clatrina se regula modulando la accesibilidad al sitio de interacción en la β -arrestina-2 de manera dependiente de la unión al receptor [201]. Sin embargo, no parece que la interacción de Rim8 con Vps23 esté modulada por la señal de pH ya que nuestros experimentos de coimmunoprecipitación revelaron que la asociación entre Rim8 y Vps23 en extractos celulares es independiente del pH del medio de cultivo (Figura R-11). En conjunto, nuestras observaciones sugieren que Vps23 está constitutivamente unido a una pequeña población de Rim8 monoubicuitilada de forma independiente del pH. Estos datos y la analogía con las β -arrestinas de mamíferos, encajan en un modelo en que la señal de pH induciría cambios conformacionales en la cola C-terminal de Rim21, lo que provocaría el reclutamiento del complejo Rim8-ESCRT-I, y de los demás complejos ESCRT, y en consecuencia desencadenaría la transmisión de la señal. Sorprendentemente, la ubiquitilación de PalF, la proteína homóloga a Rim8 en *A. nidulans*, se incrementa cuando la ruta se activa [71] y la fusión de ubiquitina a PalF es suficiente para activar la ruta incluso en ausencia de receptor [73]. Además y en consonancia con nuestras observaciones con Rim8, solo la forma ubiquitilada de PalF coimmunoprecipita con Vsp23 [53]. Estos dos hechos indican que en este organismo la interacción entre estas dos proteínas se modula en función de la señal de pH y que su unión tiene un papel positivo en la activación de la ruta. Es concebible que ello aporte un mecanismo de regulación adicional en la transmisión de la señal en el hongo filamentoso con respecto a la levadura, en la cual sería suficiente la reacción del receptor a los cambios de pH para disparar la cascada de transducción de la señal mediada por la unión de un complejo Rim8-ESCRT preformado.

La función de Rim8 no parece estar relacionada con la función clásica de las β -arrestinas, el silenciamiento, ya que no hay datos que impliquen a proteínas G en la ruta Rim. Por el contrario, el papel de Rim8 se asemeja más a la función señalizadora de las β -arrestinas. Tras su endocitosis, el complejo β -arrestina-receptor 7TM puede formar unidades señalizadoras “signalosomas” asociadas al endosoma. Estas unidades actúan como andamios que reclutan la maquinaria necesaria para activar la señalización por MAP kinasas. De igual modo, es posible que un complejo formado por Rim21, Rim8 y ESCRT-I y asociado al endosoma desencadene el reclutamiento de los demás subcomplejos ESCRT y el ensamblaje de la maquinaria necesaria para transmitir la señal mediada por la ruta *RIM*.

Varios artículos han demostrado que las α -arrestinas en levadura actúan como adaptadores implicados en la internalización de proteínas de membrana [20, 106, 127, 19]. Es interesante apuntar que la función de Rim8 es distinta, ya que se relaciona con la transducción de señales. De hecho, si atendemos a su función, Rim8 aparece como un elemento divergente dentro de la familia de las ARTs. Además, esta divergencia se ve también reflejada en su secuencia, ya que la de Rim8 es la más alejada evolutivamente (junto con Art1) de las demás [7]. Recientemente se han publicado dos artículos que abordan la cuestión de si las α -arrestinas en mamíferos, las ARRDCs, tienen papeles similares a las ARTs en levadura. En el primero de ellos, se concluía que ARRDC3 es responsable de reclutar NEDD4 al receptor β 2-adrenérgico, lo que es necesario para su ubiquitilación e internalización [122]. Estas conclusiones recuerdan a las funciones de las ARTs, aunque la proteína regulada en este caso no es un transportador, sino un receptor implicado en señalización. Sin embargo, en un estudio posterior se ha concluido que los efectos que vieron estos autores eran debidos a que el ARN de interferencia

usado para rebajar los niveles de ARRDC3 también rebajaba los de la β -arrestina-1. Este efecto, solo se complementaba con la sobreexpresión de la β -arrestina-1, de lo que se concluye que es la auténtica responsable de la internalización. Parece que en etapas posteriores y mediante una interacción con ESCRT-O, ARRDC3 podría estar implicada en dirigir el receptor a los endosomas [63]. El papel real de estas proteínas recientemente descubiertas y las semejanzas con sus homólogos en otros organismos serán sin duda objeto de un intenso estudio en los próximos años.

¿Dónde lleva a cabo Rim8 su función?

El hecho de que Rim8 coinmunoprecipite tanto con Vps23 como con Vps28 (Figura R-11 y R-12) sugiere que Rim8 media el reclutamiento de todo el complejo ESCRT-I a Rim21. Sin embargo, la localización subcelular donde esto sucede es hoy en día motivo de cierta controversia ya que existen indicios que pueden apoyar distintos modelos. En el primero de ellos, se propone que la ruta está dividida en un complejo sensor en la membrana plasmática y un complejo de procesamiento de Rim101 asociado al endosoma. En un principio, se observó que Rim20 y Rim13 interaccionan con Snf7, una proteína del complejo ESCRT-III que funciona al nivel del endosoma. Varias observaciones adicionales en apoyo de este modelo surgieron de un estudio de localización subcelular de Rim20. En él, se observó que Rim20, cuya localización es difusa en condiciones ácidas, se concentra en puntos internos en condiciones alcalinas de manera dependiente de la mayoría de las proteínas de la ruta Rim. Algunos de estos puntos colocalizan con puntos formados por Bro1, una proteína endosomal asociada a ESCRT. Además, en una cepa $\Delta vps4$, que forma un endosoma aberrante cercano a la vacuola, estos puntos están asociados a un compartimento perivacuolar [30]. Se han obtenido, además, datos similares para la localización subcelular de Rim13, la proteasa probablemente responsable del procesamiento de Rim101 [183]. En este contexto, se piensa que el complejo asociado a la membrana plasmática sufre un proceso de endocitosis que serviría de conector entre la membrana plasmática y el endosoma, donde se situaría el complejo procesador de Rim101. Sin embargo, existen varios datos que alimentan la controversia respecto a este modelo y sugieren una distribución espacial distinta para los complejos de la ruta RIM; se ha propuesto, en su lugar, que el corte proteolítico de Rim101 tenga lugar en la membrana plasmática, previo reclutamiento de toda la maquinaria requerida a esa localización (Figura D-2).

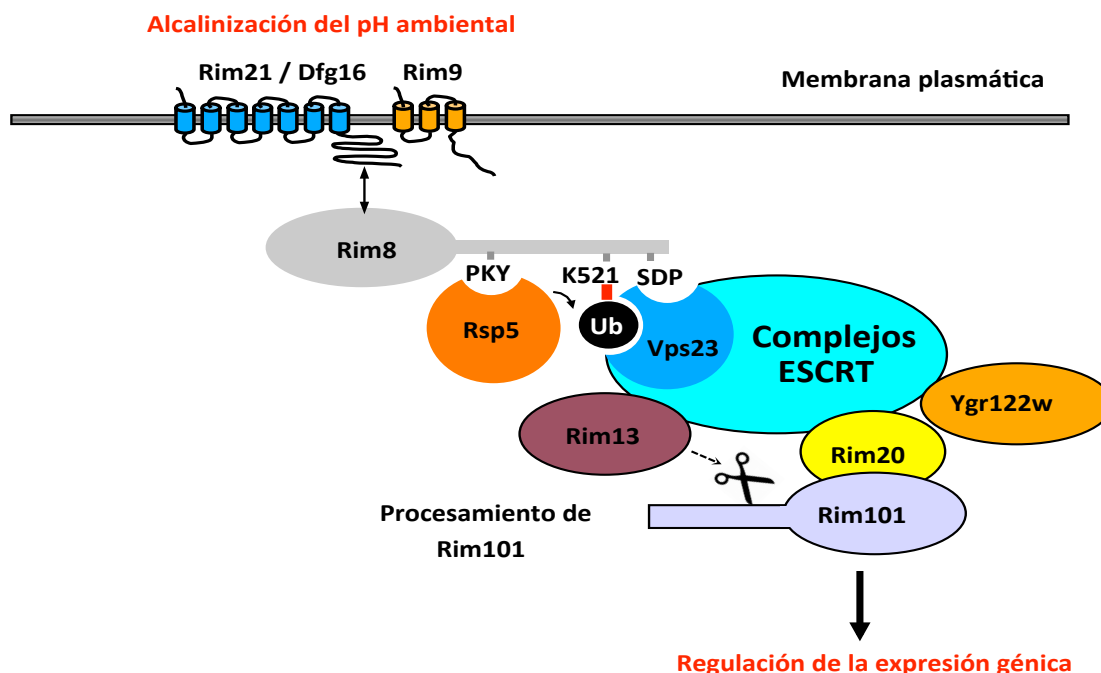


Figura D-2: **Modelo de reclutamiento de la maquinaria ESCRT a la membrana plasmática mediado por Rim8.** Al activarse la ruta por un cambio de pH, Rim8, ya ubiquitilado y unido a ESCRT-I, interacciona con Rim21 y provoca el reclutamiento del resto de los componentes de la maquinaria de procesamiento de Rim101, que se ensamblan en la membrana plasmática.

Los datos que apoyan este modelo alternativo son los siguientes:

(1) Rim8, que interacciona tanto con Rim21 como con Vps23 podría mediar la conexión entre un complejo situado en la membrana plasmática y otro endosomal. Sin embargo, es difícil pensar que Rim8 sea por sí solo responsable de esta transición entre los complejos y sería más fácil concebir que varias proteínas con funciones endocíticas participaran también en este proceso. Si este fuera el caso, resultaría sorprendente el hecho de que los rastreos genéticos realizados para identificar componentes de la ruta *RIM* no hayan encontrado este tipo de proteínas. Además, se ha examinado la implicación de las proteínas endocíticas End3 y Sla1 como proteínas candidatas a participar en la supuesta endocitosis requerida por la ruta *RIM* sin obtener ningún resultado positivo [155].

(2) Existen precedentes en que la maquinaria ESCRT es reclutada a localizaciones alternativas al endosoma, en concreto, las proteínas Gag retrovirales son capaces de reclutar los complejos ESCRT a la membrana plasmática. Este precedente demuestra que esta maquinaria puede funcionar en localizaciones distintas al endosoma y contribuye a la idea sugerente de que en realidad, en la ruta *RIM*, tanto el reclutamiento de los complejos ESCRT como de la maquinaria de procesamiento de Rim101 se lleve a cabo en la membrana plasmática, donde se localizan los putativos sensores de pH. Notablemente, un estudio reciente ha demostrado que una de las α -arrestinas en mamíferos, ARRDC1, cumple la misma función adaptadora que Rim8 y media el reclutamiento a la membrana plasmática de la proteína homóloga a Vps23, Tsg101 [121] (Figura D-3).

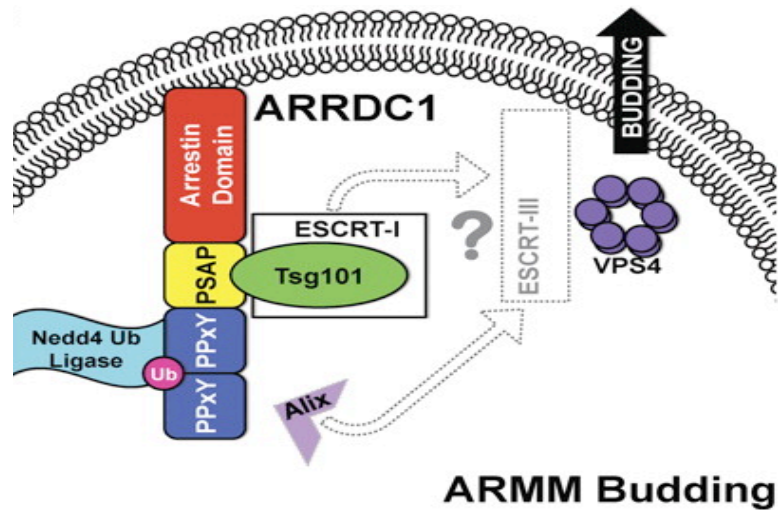


Figura D-3: La función adaptadora de las α -arrestinas Rim8 en levadura y ARDC-1 en mamíferos, está conservada. En el modelo, tomado de Nabhan *et al.* [78], se esquematiza el reclutamiento, mediado por ARDC-1, de la maquinaria ESCRT a la membrana plasmática. Se indican los motivos PPXY y PSAP relacionados con los motivos SDP y PXY de Rim8. Se muestra con línea punteada el reclutamiento, no demostrado, de ESCRT-III vía ESCRT-I o vía la proteína asociada a ESCRT Alix, que interacciona con ESCRT-III. El resultado de este fenómeno es la formación de microvesículas extracelulares, con una topología similar a la de la formación de las vesículas del MVB o de las generadas en el proceso de gemación “budding” de los retrovirus.

(3) Algunos datos obtenidos en esta tesis, parecen apoyar esta hipótesis. Rim8 expresado desde su propio promotor se localiza en puntos en la membrana plasmática al activarse la ruta *RIM*. Además, cuando se co-sobreexpresan los componentes del sistema sensor de pH, junto con Rim8, Rim21 y Rim8 colocalizan en focos en la membrana plasmática. Esta localización es similar a la de Rim8 no sobreexpresado después de un incremento de pH ambiental, por lo que podemos concluir que al activar la ruta, Rim8 es reclutado, con mucha probabilidad, a donde se localiza Rim21 en la membrana plasmática. A esto hay que añadir que en un estudio reciente se ha observado que la localización subcelular de Rim21 no sobreexpresado es muy similar a la que nosotros observamos con la proteína sobreexpresada [131]. Por otro lado, hemos demostrado que al cosobreexpresar Rim8 y Vps23, estos se relocalizan en la membrana plasmática, en múltiples puntos que recuerdan a los formados por Rim21 y Rim8. Estas observaciones sugieren que Rim8 media el reclutamiento de, al menos, el complejo ESCRT-I a la membrana plasmática. Siendo esto así, no es difícil concebir que sea en realidad toda la maquinaria ESCRT, junto con sus proteínas asociadas directa o indirectamente (Rim20, Rim13 y Rim101) la reclutada a la membrana plasmática donde confluirían todos los elementos necesarios para activar el procesamiento de Rim101 (Figura D-2).

(4) Un estudio reciente realizado en *A. nidulans* también apoya el modelo alternativo. Se ha observado que tanto PalA como PalC, los homólogos de Rim20 y Ygr122w, se localizan en puntos corticales en respuesta a un incremento de pH de manera dependiente de la proteína 7TM PalH y de los componentes de ESCRT, Vps23 y Vps32 [34, 53]. Se ha demostrado, además, que Vps23 se localiza en este tipo de estructura de forma dependiente de la señal de pH y del homólogo de Rim8, PalF [34, 53].

Lamentablemente, ninguno de estos argumentos es definitivo. Es posible que en las búsquedas masivas no se hayan encontrado las proteínas de endocitosis requeridas por la ruta *RIM* debido a que sean proteínas esenciales, lo que haría que las cepas mutantes correspondientes no se pudieran seleccionar. Por otro lado el hecho de que ni Sla1 ni End3 estén implicados, no impide que otras vías de endocitosis menos caracterizadas o desconocidas puedan llevar a cabo esta función. Algunos datos de localización que presentamos en esta tesis deben ser tomados con cautela. Así, si bien es cierto que Rim8 se localiza en la membrana plasmática al activar la ruta, esto no impide que posteriormente pueda traficar al endosoma. Por otro lado, el hecho de que al co-sobreexpresar Rim8 y Vps23, estas proteínas se relocalicen a la membrana plasmática, podría ser un artefacto debido a los altos niveles de proteína. Asimismo, la localización de PalA y PalC en estructuras corticales en *A. nidulans*, podría corresponder a endosomas situados muy cerca de la membrana plasmática. Aún así, cualquier intento de confirmar que los sucesos que llevan al corte proteolítico de Rim101 suceden en la membrana plasmática tendrá que tomar en cuenta los datos que indican que Rim20 y Rim13 se localizan en el endosoma de forma dependiente del pH. Un matiz a este respecto proviene de la observación de que, en ausencia de la proteína Bro1, Rim20 se localiza de forma preferencial en endosomas sin provocar una consecuente activación de la ruta *RIM* [31]. Teniendo esto en cuenta, se puede argumentar que los puntos de Rim20 observados en el endosoma de manera dependiente de pH pudieran corresponder también a poblaciones no activas de Rim20 y que fuera una pequeña subpoblación activa la que se reclutara a la membrana plasmática como asistente en el procesamiento de Rim101. En cualquier caso, la construcción de un modelo espacial para la distribución de los componentes de la ruta *RIM* tendrá que tener en cuenta una gran cantidad de información obtenida de diversos modos y que en ocasiones parece difícilmente conjugable, por lo que requerirá ser completada con futuros estudios.

Determinantes moleculares de la interacción de Rim8 con Vps23

El motivo SXP

Nuestros datos demuestran que el motivo SXP es un determinante molecular de la interacción con Vps23. La inactivación de este motivo en la proteína mutante Rim8-ESDP(533-536)/AAAA es suficiente para impedir la interacción con Vps23 y bloquear la ruta *RIM*. Por el contrario, hemos mostrado que la sustitución P536L debilita, pero no inactiva completamente el motivo. Aunque no hemos detectado asociación en el sistema de doble-híbrido entre Rim8-P536L y Vps23, sí que hemos observado una interacción residual entre estas proteínas en ensayos de unión *in vitro* (Figura R-4). Esta interacción débil, es suficiente para mantener la función de Rim8, como demuestran los fenotipos de crecimiento en presencia de litio (Figura R-8).

En principio, existían varios indicios que apuntaban a que el motivo SXP de Rim8 aquí descrito está relacionado con el motivo P(S/T)AP que permite el reclutamiento de ESCRT a proteínas retrovirales. Este último motivo, ampliamente caracterizado, es un determinante de interacción reconocido por la proteína homóloga a Vps23 en mamíferos, Tsg101 [55, 82, 26, 13]. El primero de estos indicios es que ambos motivos, tanto SXP como P(S/T)AP, se unen al dominio UEV de las proteínas homólogas Vps23/Tsg101. El segundo consiste en que el motivo SXP de la caja 1 de Rim8 corresponde a un motivo PSXP en la secuencia de la caja 2 presente en los homólogos de Rim8 en otros hongos. Estas proteínas contienen o la caja 1 o la caja 2 o bien ambas cajas,

lo que sugiere que los motivos PSXP y SXP desempeñan el mismo papel. Tercero, el último residuo de prolina del motivo PS/TAP en la proteína Gag del virus VIH y el del motivo SXP de Rim8 tienen una gran importancia, ya que su sustitución por un residuo de leucina reduce fuertemente la interacción *in vitro* con Tsg101 y Vps23, respectivamente. Por el contrario, la sustitución del primer residuo de prolina por alanina en el motivo PS/TAP de la proteína Gag solo reduce débilmente la interacción con Tsg101 mientras que la misma sustitución, del último residuo de prolina, bloquea la interacción [55]. Estos datos encajan bien con el hecho de que su homólogo en levaduras, Vps23, pueda unir tanto el motivo SDP de Rim8 como el motivo PSDP de Vps27. Señaladamente, en un estudio se ha demostrado que el primer residuo de prolina del motivo PSAP de la proteína Gag del virus de la inmunodeficiencia felina no se requiere para la función de esta proteína en la gemación retroviral [35].

En un artículo, publicado en 2011, se ha caracterizado por cristalografía la interacción entre el dominio UEV de Vps23 y el motivo que este reconoce en Vps27, PSDP. Los datos obtenidos, confirman la identidad de los residuos SDP como la unidad funcional del motivo. Vps27 posee dos motivos PSDP necesarios para la interacción con Vps23 [26] y en la estructura cristalina del complejo, se observa claramente como los tres residuos del motivo SDP son los que forman las interacciones más importantes, lo que es coherente con el motivo que nosotros hemos identificado en el adaptador alternativo a Vps27, Rim8, en el que el primer residuo de prolina está ausente. Sin embargo, estos hallazgos tienen implicaciones sorprendentes; la resolución anterior de la estructura cristalina correspondiente al motivo PTAP de la proteína Gag (también presente en ESCRT-0 de mamíferos como PSAP) junto con el dominio UEV de Tsg101 indicaba que el residuo de alanina se encuentra inmerso en un “bolsillo hidrofóbico” del dominio UEV de Tsg101 [145], de tal modo que no era posible que el residuo de aspártico del motivo SDP encajara en él. Esto implicaba que la interacción entre proteínas homólogas, que se había considerado totalmente conservada, no pudiera explicarse por los mismos detalles moleculares. Esta aparente incoherencia ha quedado explicada con la resolución de la estructura cristalina del complejo PSDP-Vps23 UEV, ya que se ha demostrado que la superficie del dominio UEV de Vps23 que une este motivo, es totalmente distinta a la superficie del dominio UEV de Tsg101 que une el motivo PS/TAP. Estos hallazgos ponen de manifiesto el hecho sorprendente de que dos motivos muy similares en dos proteínas homólogas, que unen los mismos dominios conservados en sus respectivos interactores homólogos, usen regiones y mecanismos de interacción distintos. Estas discrepancias son sorprendentes a nivel evolutivo y cómo puede haber surgido es una cuestión importante. Si observamos las proteínas Vps23 de algunos hongos podemos encontrar casos en los que estas proteínas contienen tanto el sitio de reconocimiento para PS/TAP como el para (P)SDP, lo que sugiere que en adaptadores de ESCRT en alguno de estos organismos se pudieran encontrar ambos tipos de motivos [152].

Monoubicuitilación de Rim8

Hemos aportado pruebas genéticas y bioquímicas que demuestran que un residuo de lisina monoubicuitilado localizado 12 residuos aguas arriba del motivo SXP contribuye a la interacción con Vps23 *in vivo*. De hecho, la sobreexpresión de ubiquitina restaura parcialmente la interacción en el sistema de doble-híbrido entre Vps23 y la proteína mutante Rim8-P536L. Este efecto es, además, completamente dependiente de la presencia del residuo monoubicuitilado. Por otro lado, los ensayos de coinmunoprecipitación y de unión *in vitro*

indican que Vps23 se une casi en exclusiva a la forma ubiquitilada de Rim8. Además, hemos realizado ensayos de unión *in vitro* al dominio UEV de Vps23 con las regiones C-terminales de Rim8 y de una forma mutante en la que se ha eliminado el motivo SXP, Rim8-CT(ESDP/AAAA), ambas previamente ubiquitiladas *in vitro*. Estos ensayos, en los que hemos utilizado condiciones más restrictivas para detectar solo las interacciones más fuertes, han demostrado que ambos elementos, el residuo K521 monoubiquitilado y el motivo SXP, son necesarios para generar una unión estable al dominio UEV de Vps23. En consonancia con estos resultados, la inactivación parcial del motivo SXP mediante la sustitución P536L solo bloquea la ruta *RIM* si además se sustituye el residuo K521 por un residuo de arginina. La coexistencia de estos dos determinantes de interacción es consecuente con el hecho de que las regiones de Vps23 que los reconocen no son solapantes, lo que permite que una misma molécula una ambos elementos al mismo tiempo [152].

La eliminación del residuo monoubiquitilado en Rim8 no produce un fenotipo de pérdida de función y, según hemos mostrado, solo provoca un ligero defecto de crecimiento en presencia de litio. Esto se puede deber a que el papel de la ubiquitina en la ruta *RIM* sea inapreciable con nuestras condiciones de estudio; es decir, que la unión entre Rim8-K521R y Vps23 dependiente del motivo SXP sea, aunque más débil, suficiente para el funcionamiento de la ruta. También puede deberse a que en ausencia del residuo K521, otros residuos de lisina se ubiquitilen y suplan su función. En este caso, la fracción ubiquitilada de Rim8 tendría que ser muy minoritaria ya que no la hemos detectado en ensayos de inmunoblot. Por último es posible que la función de la ubiquitilación de Rim8 no esté directamente relacionada con la ruta *RIM*. En este caso una función candidata sería la de “ocupar” la región de unión a ubiquitina del dominio UEV de Vps23. Este dominio, en la ruta del MVB, une tanto el motivo PSDP de Vps27 como la ubiquitina del cargo. Las moléculas de Vps23 unidas a Rim8 solo mediante el motivo SDP tendrían libre la región de unión a ubiquitina y podrían así unir ubiquitinas conjugadas a cargos no asociados con la ruta *Rim*, provocando el bloqueo de su tránsito a través de la ruta del MVB. Si esto fuera así, se esperaría ver un defecto en el tráfico endosomal de algunos cargos en presencia de la proteína mutante Rim8-K521R. Esperamos que futuros estudios arrojen algo más de luz sobre esta cuestión.

Rim8 es ubiquitilado de manera independiente del pH (independiente en el rango detectable, no podemos destacar pequeñas variaciones) por Rsp5, una ubiquitina ligasa de la familia de Nedd4. La ubiquitilación de Rim8 es indetectable en un mutante *npi* que tiene niveles muy bajos de Rsp5 (no se puede eliminar *RSP5* ya que es un gen esencial). Además, un motivo PXY localizado 12 residuos aguas arriba del residuo ubiquitilado de Rim8 media la interacción directa con los dominios WW de Rsp5 y es necesario para la ubiquitilación de Rim8 *in vivo*. Asimismo, Rsp5 ubiquitila *in vitro* el extremo C-terminal de Rim8 de manera dependiente de este motivo PXY. En una publicación surgida durante el desarrollo de este trabajo se presentó un resultado que llevó a los autores a afirmar que Rim8 era la única de las proteínas ART que no interaccionaba con Rsp5 [106]. Del conjunto de los datos que se presentan en esta tesis, no se puede más que concluir que esta aseveración es errónea.

Función de un dominio de unión a ubiquitina en la monoubiquitilación de Rim8

Nuestros resultados indican que la unión del dominio UEV de Vps23 al motivo SXP de Rim8 tiene un gran impacto sobre su ubiquitilación. *In vivo*, la ubiquitilación de Rim8 es indetectable en mutante $\Delta vps23$, pero se restaura e incluso se incrementa al sobreexpresar el dominio UEV. Este efecto es dependiente, además, de la

capacidad del dominio UEV de unir ubiquitina. La interpretación de estos datos se podría construir sobre la base de un modelo en que la unión de Vps23 a Rim8 sucede en dos pasos. Primeramente, Vps23 uniría el motivo SXP de Rim8 y la ubiquitina situada en el sitio catalítico de la ligasa Rsp5. Estas dos interacciones harían posible el correcto posicionamiento de la ubiquitina y facilitarían su consecuente conjugación con el residuo K521 en Rim8. Seguidamente, la ubiquitilación de Rim8 estabilizaría la unión a Vps23. La ubiquitilación residual de la proteína mutante Rim8-P536L (que todavía mantiene una interacción débil con Vps23, como demuestra el ensayo de unión *in vitro*) explicaría el hecho de que esta mutación no provoca un bloqueo de la ruta *RIM* a menos que se elimine el residuo K521. La hipótesis de que la unión del dominio UEV de Vps23 a ubiquitina precede a la conjugación de esa misma ubiquitina a Rim8 parecía verse apoyada por el descubrimiento de que el dominio UEV de otra proteína, Mms2, media el correcto posicionamiento de la ubiquitina requerido para la formación de cadenas con el enlace específico K63, que también es el que mayoritariamente cataliza Rsp5 [42].

Comprobar la veracidad de esta hipótesis era difícil *in vivo* ya que no podíamos estar seguros de que los efectos observados estuvieran provocados directamente por los elementos que nosotros considerábamos y no por cascadas de reacciones que involucraran a estos y otros elementos no identificados. Por ello decidimos establecer un sistema de ubiquitilación *in vitro* con las proteínas purificadas que nos permitiera analizar los efectos en un contexto controlado en el que conociamos qué proteínas estaban presentes. *In vitro*, la ubiquitilación de Rim8 no requiere la presencia del dominio UEV de Vps23; aunque, sin embargo, al añadirlo observamos que se bloquea la extensión de la cadena de ubiquitina y obtenemos un sustrato, Rim8, conjugado con una sola molécula de ubiquitina. Esto sucede de manera dependiente de los mismos determinantes necesarios para obtener Rim8 monoubicuitilado *in vivo*. Estos resultados indican que, al menos *in vitro*, para la adición de la primera ubiquitina no se requiere la presencia de Vps23 y se confirman por el hecho de que cuando usamos ubiquitina que no puede ser poliubiquitilada, el dominio UEV deja de tener efecto alguno. En este contexto, la hipótesis que planteábamos anteriormente (el dominio UEV “promueve” la adición de la primera ubiquitina) no podía ser válida, al menos *in vitro*. Estos datos parecían indicar con más probabilidad que el hecho de que no observáramos la ubiquitilación de Rim8 *in vivo*, en ausencia de Vps23, se debía a que en esas condiciones Rim8 se poliubiquitila y a que la función de Vps23 es la de bloquear la extensión de la cadena impidiendo la adición de la segunda molécula de ubiquitina.

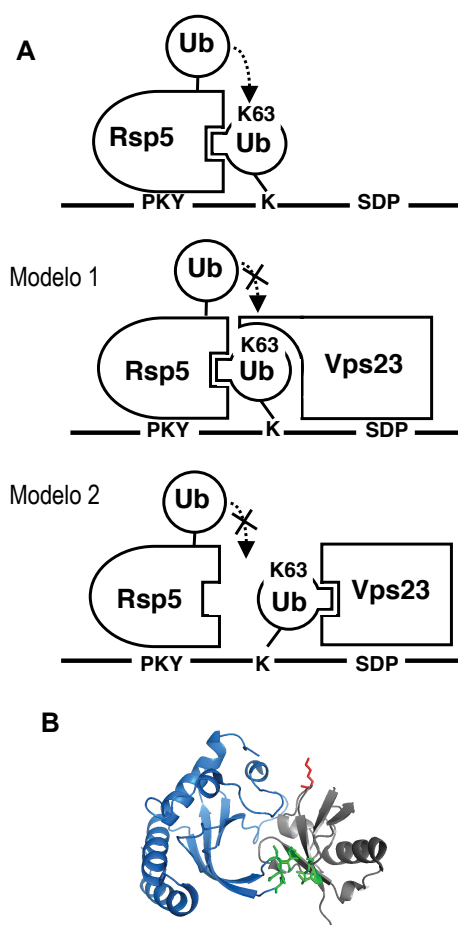
Esta hipótesis la hemos confirmado *in vivo*. Hemos demostrado que cuando la única ubiquitina presente en la célula es una que carece del residuo K63, Rim8 se monoubicuitila en ausencia de Vps23. Concluimos de ello que *in vivo* Vps23 bloquea la formación de cadenas enlazadas en K63 sobre Rim8.

Queda por explicar el porqué de que no hayamos podido observar esa poliubiquitilación *in vivo* en ausencia de Vps23, pero sugerimos 3 posibilidades. La primera es que al poliubiquitilarse Rim8 sea sustrato de una deubiquitilasa que elimine esta modificación devolviendo a Rim8 a su estado no modificado. La segunda es que Rim8 poliubiquitilado en K63 sea degradado por el proteasoma. De hecho, existe un precedente en que proteínas modificadas por este tipo de cadenas son sustrato del proteasoma [159]. La tercera tiene en cuenta que la fracción ubiquitilada de Rim8 es muy minoritaria y que su poliubiquitilación resultaría en la división en

múltiples bandas de una banda que ya se encuentra cerca del límite de la detección con nuestros métodos, lo que explicaría que no seamos capaces de observarla.

En resumen, el modelo general que proponemos para la ubiquitilación de Rim8 es el siguiente (Figura D-4 A). En un primer paso, Rsp5 se une al motivo PKY de la región C-terminal de Rim8 y cataliza la conjugación de la primera molécula de ubiquitina con el residuo K521 de Rim8. En ausencia de Vps23 la cadena es extendida en sucesivas rondas de ubiquitilación con enlaces en K63, de acuerdo con nuestros resultados *in vivo* y con los datos obtenidos *in vitro* con otros sustratos que contienen motivos PY [84]. En estudios anteriores se ha demostrado que la extensión de la cadena es dependiente de un dominio de unión a ubiquitina (lóbulo-N) situado en el extremo amino-terminal del dominio HECT de Rsp5, que actúa localizando y orientando la primera ubiquitina conjugada disponiéndola para que acepte la adición de la segunda [86].

Figura D-4: 2 Posibles modelos por los que Vps23 impide que Rim8 se poliubiquitile. (A) Tras catalizar la unión de la primera ubiquitina, Rsp5 la une y posiciona, de manera que el residuo de lisina aceptor (K63) quede en la posición adecuada para la adición de la segunda ubiquitina. Modelo 1; Vps23 interacciona con el motivo SDP de Rim8 y con la ubiquitina ya conjugada. Esta última interacción “tapa” el residuo K63 de la ubiquitina impidiendo la extensión de la cadena. Modelo 2; Vps23 y Rsp5 compiten por interactuar con la misma región de la ubiquitina, de manera que Rsp5 no puede posicionar la primera molécula para añadir la segunda. (B) Complejo Vps23UEV-ubiquitina (PDB 1UZX). Se destaca en rojo el residuo K63, que se encuentra “expuesto”. El dominio UEV se muestra en azul y la ubiquitina en gris. Los residuos que median la interacción UEV-ubiquitina [(SDG(55-57) en UEV y la superficie hidrofóbica L8-I44-V70 en la ubiquitina) están coloreados de verde.



Para explicar cómo Vps23 impide la segunda ronda de reacción se pueden sopesar dos modelos. En el primero, la interacción del dominio UEV de Vps23 con la primera ubiquitina conjugada con Rim8 restringe el acceso al residuo K63 de la ubiquitina (Figura D-4 A, modelo 1). Sin embargo, existen estudios que no apoyan esta hipótesis ya que este residuo está completamente expuesto en el complejo UEV/ubiquitina [185] y no es probable que la unión al motivo SDP produzca cambios conformacionales en el dominio UEV [152] (Figura D-4 B). Además, hemos demostrado que la poliubiquitinación de Rim8 no impide la interacción *in vitro* mediada por ubiquitina con el dominio UEV de Vps23 (Figura R-23), lo cual es un buen argumento a favor de que el residuo

Discusión

de lisina aceptor en la ubiquitina esté localizado fuera de la superficie de interacción con el dominio UEV. Por estas razones, creemos que un modelo alternativo puede acercarse mucho más a la realidad. En este modelo, la competición del dominio UEV de Vps23 con el lóbulo-N de Rsp5 (recordemos que para la extensión de la cadena es necesaria su unión a ubiquitina) por unir la primera ubiquitina conjugada, impide el correcto posicionamiento de esta última imposibilitando la poliubiquitilación (Figura D-4 A, modelo 2). El argumento más firme en apoyo de esta hipótesis es que tanto el dominio UEV como el lóbulo-N de Rsp5, que unen ubiquitina con baja afinidad, reconocen la misma región hidrofóbica en la ubiquitina [185, 86]. Esto implica que estas dos interacciones son mutuamente excluyentes y que la unión del dominio UEV a la primera ubiquitina conjugada a Rim8 debería impedir la extensión de la cadena.

Parece, por otro lado, que la distancia que separa el motivo SDP del residuo ubiquitilado (K521) tiene un papel clave en el efecto mediado por el dominio UEV. Proponemos que esta distancia, que tiene una alta conservación en los homólogos de Rim8 en otros hongos, debe mantenerse para garantizar que el dominio UEV unido al motivo SDP interaccione con la primera ubiquitina conjugada con Rim8. Esto, además, explicaría por qué el dominio UEV de Vps23 no impide la extensión *in vitro* de cadenas de ubiquitina conjugadas a otros residuos de lisina próximos al residuo K521.

En conjunto, nuestros resultados han revelado un nuevo mecanismo por el que se restringe la actividad ubiquitina ligasa y se genera un sustrato monoubiquitilado. La longitud de la cadena de ubiquitina en un sustrato dicta varias consecuencias funcionales. Sin embargo, los mecanismos por los que se modula están aun poco caracterizados. Anteriormente se había descrito un proceso llamado “monoubiquitilación acoplada” por el que algunos sustratos son monoubiquitilados de manera dependiente de un dominio de unión a ubiquitina (UBD) incluido en la propia proteína sustrato. Estos sustratos no interaccionan con la ubiquitina ligasa mediante motivos PY sino que lo hacen porque su propio UBD interacciona con una ubiquitina conjugada a un residuo de lisina de la enzima. Cuando la ubiquitina ligasa cataliza la primera reacción de ubiquitilación del sustrato, el UBD del sustrato deja de unir la ubiquitina de la ligasa y pasa a interaccionar en *cis* con la que se acaba de añadir a la propia molécula que contiene el UBD. Por lo tanto, tan pronto como se añade la primera ubiquitina, este mecanismo de “cambio de ubiquitina unida por el UBD” provoca la liberación de la ligasa (a la cual ya no se puede unir el UBD, por estar ocupado por la ubiquitina que se acaba de añadir a la propia molécula que contiene el UBD). De este modo, la característica intrínseca de este mecanismo es que solo puede generar proteínas monoubiquitiladas.

Sin embargo, hasta ahora no se había logrado explicar cómo otro tipo de sustratos, que carecen de dominios de unión a ubiquitina y que por el contrario reconocen la ubiquitina ligasa vía motivos PY, son monoubiquitilados en lugar de poliubiquitilados. En este trabajo hemos extendido el conocimiento sobre estos fenómenos con el descubrimiento de que puede ser suficiente con que el sustrato posea un motivo de unión para un UBD que actúa en *trans* posibilitando su monoubiquitilación. Parece muy probable que este mecanismo no vaya a ser exclusivo de Rim8 y creemos que en un futuro próximo se hará extensible a otras proteínas sustrato que se monoubiquitilan por Rsp5 y Nedd4 y que unen proteínas con dominio UBD.

Existen, además, datos que parecen indicar que algunas proteínas de mamíferos están reguladas por un mecanismo molecular similar. Por ejemplo, ya hay datos publicados que sugieren que el homólogo en mamíferos de Vps23, Tsg101, promueve la monoubicuitilación del factor de transcripción antagonista de la apoptosis (AATF) impidiendo su poliubiquitilación [32]. Por otro lado, se ha propuesto que Tsg101 promueve la degradación de la proteína p53 impidiendo la poliubiquitilación de Mdm2, la ubiquitina ligasa responsable de marcar p53 para degradación por el proteasoma [177].

Paralelismos entre la ruta *RIM* y la gemación de los retrovirus.

De manera sorprendente, los descubrimientos a los que nos ha llevado este trabajo junto con los de estudios previos, indican que motivos iguales o relacionados, median el reclutamiento de la maquinaria ESCRT a proteínas de la ruta *pal/RIM* en hongos y a las proteínas Gag retrovirales en células de mamífero (Figura D-5).

El reclutamiento de Tsg101, AIP1/Alix y de ubiquitina ligasas de la familia de Nedd4 a las proteínas virales está mediado por los motivos P(S/T)AP, YPXL, y PPXY, respectivamente [120]. En nuestros estudios, hemos demostrado que los motivos SXP y PXY situados en el extremo C-terminal de Rim8 interactúan con los homólogos en hongos de Tsg101 y de Nedd4, Vps23 y Rsp5, respectivamente y previamente se había descubierto que los motivos YPX(L/I) de PacC (el homólogo en *A. nidulans* de Rim101) interactúan con el homólogo de AIP1/Alix, PalA [195] (Figura D-5).

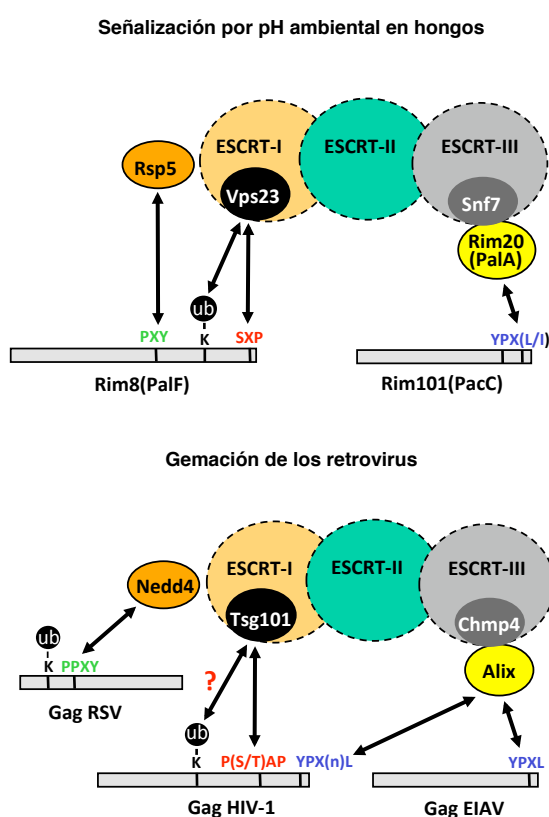


Figura D-5: **Conservación de las interacciones entre la maquinaria ESCRT y proteínas de la ruta *pal/RIM* o proteínas Gag retrovirales.** Se muestra una representación no a escala de los dos componentes de la ruta *pal/RIM* en *S. cerevisiae*, Rim8 y Rim101, y las proteínas retrovirales Gag del virus del sarcoma de Rous (RSV), HIV-1 y del virus de la anemia infecciosa equina (EIAV). Se indican las posiciones de los motivos PXY, SXP y YPX(L/I) en las proteínas de levadura y los motivos relacionados PPXY, P(S/T)AP y YPXL de las proteínas retrovirales Gag. Se indica la monoubicuitilación (Ub) de las proteínas. Se resalta la conservación de la maquinaria ESCRT y de sus proteínas asociadas en hongos y en vertebrados. Las flechas dobles indican interacciones proteína-proteína.

Las similitudes entre los procesos implicados en la señalización por la ruta *pal/RIM* en hongos y la gemación de los retrovirus en mamíferos, se apoyan todavía en otra demostración. Mientras que la fusión de

Discusión

Tsg101 a la proteína Gag del VIH restaura la gemación de este retrovirus en ausencia del motivo PTAP de interacción con Tsg101 en la proteína Gag [117], la fusión de Vps23 a Rim8 truncado en su extremo C-terminal, restaura la función de Rim8 en la ruta *RIM*. Además, se ha sugerido que la unión de la proteína Gag del VIH a Tsg101 mediada por el motivo PTAP podría estabilizarse por la monoubicuitilación de Gag [55]. Nuestros datos muestran que tal mecanismo molecular sucede en la ruta *RIM*, donde tanto el motivo SXP como el residuo monoubicuitilado de Rim8 contribuyen a la interacción con Vps23. Por último, hemos observado que la sobreexpresión de Rim8 dirige Vps23 a la membrana plasmática de una manera que recuerda la relocalización de la proteína Gag del VIH a la membrana plasmática de forma dependiente de Tsg101 en células de mamífero [128]. Por todas estas razones, creemos firmemente que el estudio de la ruta *RIM* en levadura es un excelente abordaje que nos ayudará a comprender los mecanismos moleculares implicados en la gemación de los retrovirus en mamíferos.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. La región N-terminal de Rim8, que contiene los dominios arrestina, interacciona con la región C-terminal de la proteína 7TM Rim21.
2. Rim8, mediante su región C-terminal, interacciona directamente con el dominio UEV de la subunidad Vps23 del complejo ESCRT-I. Esta interacción es imprescindible para la transducción de la señal de pH ambiental mediada por la ruta Rim.
3. Las subunidades Vps23 y Vps28 de ESCRT-I están asociadas a Rim8 en extractos celulares.
4. La E3 ubiquitina ligasa Rsp5, que interacciona con un motivo PXY en Rim8, monoubicuitila el residuo K521, localizado en la región C-terminal de Rim8, de forma independiente de la activación de la ruta Rim.
5. Tanto el residuo monoubicuitilado como un motivo SXP altamente conservado en la región C-terminal de Rim8, son los responsables conjuntos de la interacción con Vps23.
6. La unión del dominio UEV de Vps23 al motivo SXP y a ubiquitina bloquea la poliubiquitilación de Rim8, lo que resulta en la monoubicuitilación de esta proteína.
7. Al activarse la ruta Rim, Rim8 se acumula en focos situados en la membrana plasmática y al co-sobreexpresarlo junto con Vps23, estas dos proteínas colocalizan, de manera dependiente de su interacción, en un mayor número de este mismo tipo de estructuras.
8. En condiciones de sobreexpresión de los distintos componentes del complejo sensor de pH, Rim8 y la proteína 7TM Rim21 colocalizan en focos situados en la membrana plasmática.
9. Rim8, un miembro de la familia de las arrestinas, es la primera proteína caracterizada que dirige la función de la maquinaria ESCRT a una ruta de señalización celular.
10. Mediante una interacción dual y directa, Rim8 actúa como un adaptador que permite la conexión de la proteína 7TM Rim21 con los complejos ESCRT, en el contexto de la ruta Rim.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía.

1. Alani, E., L. Cao, and N. Kleckner, *A method for gene disruption that allows repeated use of URA3 selection in the construction of multiply disrupted yeast strains*. Genetics, 1987. **116**(4): p. 541-5.
2. Alvarez, C.E., *On the origins of arrestin and rhodopsin*. BMC Evol Biol, 2008. **8**: p. 222.
3. Ariño, J., *Integrative responses to high pH stress in S. cerevisiae*. OMICS, 2010. **14**(5): p. 517-23.
4. Arst, H.N., Jr. and M.A. Peñalva, *pH regulation in Aspergillus and parallels with higher eukaryotic regulatory systems*. Trends in Genetics, 2003. **19**(4): p. 224-231.
5. Asao, H., et al., *Hrs is associated with STAM, a signal-transducing adaptor molecule. Its suppressive effect on cytokine-induced cell growth*. J Biol Chem, 1997. **272**(52): p. 32785-91.
6. Attramadal, H., et al., *β -arrestin2, a novel member of the arrestin/ β -arrestin gene family*. J Biol Chem, 1992. **267**(25): p. 17882-90.
7. Aubry, L., D. Guetta, and G. Klein, *The arrestin fold: variations on a theme*. Curr Genomics, 2009. **10**(2): p. 133-42.
8. Babst, M., *A protein's final ESCRT*. Traffic, 2005. **6**(1): p. 2-9.
9. Babst, M., et al., *Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p*. EMBO J, 1997. **16**: p. 1820-1831.
10. Babst, M., et al., *Endosome-Associated Complex, ESCRT-II, Recruits Transport Machinery for Protein Sorting at the Multivesicular Body*. Dev.Cell, 2002. **3**: p. 283-289.
11. Babst, M., et al., *Escrt-III. An endosome-associated heterooligomeric protein complex required for MVB sorting*. Dev.Cell, 2002. **3**: p. 271-282.
12. Babst, M., et al., *The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function*. EMBO J., 1998. **17**: p. 2982-2993.
13. Bache, K.G., et al., *Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes*. The Journal of Cell Biology, 2003. **162**(3): p. 435-442.
14. Bachmann, B.J., *Linkage map of Escherichia coli K-12, edition 7*. Microbiol Rev, 1983. **47**(2): p. 180-230.
15. Banta, L.M., et al., *Organelle assembly in yeast: characterization of yeast mutants defective in vacuolar biogenesis and protein sorting*. J Cell Biol, 1988. **107**(4): p. 1369-83.
16. Bartel, P.L., et al., *Using the two hybrid system to detect protein-protein interactions, in Cellular interactions in development: a practical approach*, H. D.A, Editor 1993, IRL Press, Oxford. p. 153-179.
17. Barwell, K.J., et al., *Relationship of DFG16 to the Rim101p pH Response Pathway in Saccharomyces cerevisiae and Candida albicans*. Eukaryotic Cell, 2005. **4**(5): p. 890-899.
18. Becuwe, M., et al., *A molecular switch on an arrestin-like protein relays glucose signaling to transporter endocytosis*. J Cell Biol, 2012: p. in press.
19. Becuwe, M., et al., *A molecular switch on an arrestin-like protein relays glucose signaling to transporter endocytosis*. J Cell Biol, 2012. **196**(2): p. 247-59.

Bibliografia

20. Becuwe, M., et al., *Ubiquitin-mediated regulation of endocytosis by proteins of the arrestin family*. Biochem Res Int, 2012. **2012**: p. 242764.
21. Benovic, J.L., et al., *Functional desensitization of the isolated β -adrenergic receptor by the β -adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 8879-82.
22. Berthouze, M., et al., *The deubiquitinases USP33 and USP20 coordinate β 2 adrenergic receptor recycling and resensitization*. EMBO J, 2009. **28**(12): p. 1684-96.
23. Bhandari, D., et al., *Arrestin-2 interacts with the ubiquitin-protein isopeptide ligase atrophin-interacting protein 4 and mediates endosomal sorting of the chemokine receptor CXCR4*. J Biol Chem, 2007. **282**(51): p. 36971-36979.
24. Bhandari, D., S.L. Robia, and A. Marchese, *The E3 ubiquitin ligase atrophin interacting protein 4 binds directly to the chemokine receptor CXCR4 via a novel WW domain-mediated interaction*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(5): p. 1324-39.
25. Bilodeau, P.S., et al., *The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(7): p. 534-9.
26. Bilodeau, P.S., et al., *Vps27-Hse1 and ESCRT-I complexes cooperate to increase efficiency of sorting ubiquitinated proteins at the endosome*. The Journal of Cell Biology, 2003. **163**(2): p. 237-243.
27. Boase, N.A. and J.M. Kelly, *A role for creD, a carbon catabolite repression gene from Aspergillus nidulans, in ubiquitination*. Mol Microbiol, 2004. **53**(3): p. 929-940.
28. Bonifacino, J.S. and R. Rojas, *Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(8): p. 568-79.
29. Boura, E., et al., *Solution structure of the ESCRT-I and -II supercomplex: implications for membrane budding and scission*. Structure, 2012. **20**(5): p. 874-86.
30. Boysen, J.H. and A.P. Mitchell, *Control of Bro1-Domain Protein Rim20 Localization by External pH, ESCRT Machinery, and the Saccharomyces cerevisiae Rim101 Pathway*. Molecular Biology of the Cell, 2006. **17**(3): p. 1344-1353.
31. Boysen, J.H., S. Subramanian, and A.P. Mitchell, *Intervention of Bro1 in pH-responsive Rim20 localization in Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryot Cell, 2010. **9**(4): p. 532-8.
32. Burgdorf, S., P. Leister, and K.H. Scheidtmann, *TSG101 interacts with apoptosis-antagonizing transcription factor and enhances androgen receptor-mediated transcription by promoting its monoubiquitination*. J Biol Chem, 2004. **279**(17): p. 17524-34.
33. Calcagno-Pizarelli, A.M., et al., *Establishment of the Ambient pH Signaling Complex in Aspergillus nidulans: Pal Assists Plasma Membrane Localization of PalH*. Eukaryotic Cell, 2007. **6**(12): p. 2365-2375.
34. Calcagno-Pizarelli, A.M., et al., *Rescue of Aspergillus nidulans severely debilitating null mutations in ESCRT-0, I, II and III genes by inactivation of a salt-tolerance pathway allows examination of ESCRT gene roles in pH signalling*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 23): p. 4064-76.

35. Calistri, A., et al., *Role of the feline immunodeficiency virus L-domain in the presence or absence of Gag processing: Involvement of ubiquitin and Nedd4-2s ligase in viral egress*. J.cell.physiol., 2008.
36. Carlton, J.G. and J. Martin-Serrano, *Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery*. Science, 2007. **316**(5833): p. 1908-12.
37. Chang, A., et al., *Rsp5 WW domains interact directly with the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II*. J Biol Chem, 2000. **275**(27): p. 20562-20571.
38. Collins, B.M., et al., *Structure of Vps26B and mapping of its interaction with the retromer protein complex*. Traffic, 2008. **9**(3): p. 366-79.
39. Craft, C.M., D.H. Whitmore, and A.F. Wiechmann, *Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family*. J Biol Chem, 1994. **269**(6): p. 4613-9.
40. DeFea, K.A., et al., *β -arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2*. J Cell Biol, 2000. **148**(6): p. 1267-81.
41. DeWire, S.M., et al., *β -arrestins and cell signaling*. Annu Rev Physiol, 2007. **69**: p. 483-510.
42. Eddins, M.J., et al., *Mms2-Ubc13 covalently bound to ubiquitin reveals the structural basis of linkage-specific polyubiquitin chain formation*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(10): p. 915-920.
43. Edeling, M.A., et al., *Molecular switches involving the AP-2 β 2 appendage regulate endocytic cargo selection and clathrin coat assembly*. Dev Cell, 2006. **10**(3): p. 329-42.
44. Erpapazoglou, Z., et al., *A dual role for K63-linked ubiquitin chains in multivesicular body biogenesis and cargo sorting*. Mol Biol Cell, 2012. **23**(11): p. 2170-83.
45. Erpapazoglou, Z., et al., *Substrate- and ubiquitin-dependent trafficking of the yeast siderophore transporter Sit1*. Traffic, 2008. **9**(8): p. 1372-91.
46. Fan, G.H., et al., *Hsc/Hsp70 interacting protein (hip) associates with CXCR2 and regulates the receptor signaling and trafficking*. J Biol Chem, 2002. **277**(8): p. 6590-7.
47. Ferguson, S.S., et al., *Role of β -arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization*. Science, 1996. **271**: p. 363-366.
48. Filimonenko, M., et al., *Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease*. J Cell Biol, 2007. **179**(3): p. 485-500.
49. Funakoshi, M. and M. Hochstrasser, *Small epitope-linker modules for PCR-based C-terminal tagging in Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 2009. **26**(3): p. 185-92.
50. Futai, E., et al., *The protease activity of a calpain-like cysteine protease in Saccharomyces cerevisiae is required for alkaline adaptation and sporulation*. Mol.Gen.Genet., 1999. **260**: p. 559-568.
51. Galan, J.M. and R. Haguenaer-Tsapis, *Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein*. EMBO J, 1997. **16**(19): p. 5847-54.
52. Galan, J.M., et al., *Ubiquitination mediated by the Npi1p/Rsp5p ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease*. J Biol Chem, 1996. **271**(18): p. 10946-52.
53. Galindo, A., et al., *An ordered pathway for the assembly of fungal ESCRT-containing ambient pH signalling complexes at the plasma membrane*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 7): p. 1784-95.

Bibliografia

54. Galindo, A., et al., *PalC, one of two Bro1 domain proteins in the fungal pH signalling pathway, localizes to cortical structures and binds Vps32*. Traffic, 2007. **8**(10): p. 1346-1364.
55. Garrus, J.E., et al., *Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding*. Cell, 2001. **107**: p. 55-65.
56. Gill, D.J., et al., *Structural insight into the ESCRT-II link and its role in MVB trafficking*. EMBO J, 2007. **26**(2): p. 600-12.
57. Gillooly, D.J., et al., *Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells*. EMBO J, 2000. **19**(17): p. 4577-88.
58. Goodman, O.B., Jr., et al., *Arrestin/clathrin interaction. Localization of the arrestin binding locus to the clathrin terminal domain*. J Biol Chem, 1997. **272**(23): p. 15017-22.
59. Goodman, O.B., Jr., et al., *β -arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the β 2-adrenergic receptor*. Nature, 1996. **383**: p. 447-450.
60. Gupta, R., et al., *Ubiquitination screen using protein microarrays for comprehensive identification of Rsp5 substrates in yeast*. Mol.Syst.Biol., 2007. **3**.
61. Gurevich, V.V. and E.V. Gurevich, *The molecular acrobatics of arrestin activation*. Trends in Pharmacological Sciences, 2004. **25**(2): p. 105-111.
62. Haigler, H.T., J.A. McKanna, and S. Cohen, *Direct visualization of the binding and internalization of a ferritin conjugate of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431*. J Cell Biol, 1979. **81**(2): p. 382-95.
63. Han, S.O., R.P. Kommaddi, and S.K. Shenoy, *Distinct roles for β -arrestin2 and arrestin-domain-containing proteins in β (2) adrenergic receptor trafficking*. EMBO Rep, 2012.
64. Hanyaloglu, A.C. and M. von Zastrow, *Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2008. **48**: p. 537-68.
65. Hartmann-Petersen, R., M. Seeger, and C. Gordon, *Transferring substrates to the 26S proteasome*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(1): p. 26-31.
66. Hatakeyama, R., et al., *Endocytosis of the aspartic acid/glutamic acid transporter Dip5 is triggered by substrate-dependent recruitment of the Rsp5 ubiquitin ligase via the arrestin-like protein Aly2*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(24): p. 5598-607.
67. Hayashi, M., et al., *Constitutive Activation of the pH-Responsive Rim101 Pathway in Yeast Mutants Defective in Late Steps of the MVB/ESCRT Pathway*. Molecular and Cellular Biology, 2005. **25**(21): p. 9478-9490.
68. Hein, C., et al., *NPI1, an essential yeast gene involved in induced degradation of Gap1 and Fur4 permeases, encodes the Rsp5 ubiquitin-protein ligase*. Mol Microbiol, 1995. **18**(1): p. 77-87.
69. Henne, W.M., et al., *The Endosomal Sorting Complex ESCRT-II Mediates the Assembly and Architecture of ESCRT-III Helices*. Cell, 2012. **151**(2): p. 356-71.
70. Henne, W.M., N.J. Buchkovich, and S.D. Emr, *The ESCRT pathway*. Dev Cell, 2011. **21**(1): p. 77-91.
71. Herranz, S., et al., *Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi*. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 2005. **102**(34): p. 12141-12146.

72. Hershko, A. and A. Ciechanover, *The ubiquitin system*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 425-79.
73. Hervás-Aguilar, A., A. Galindo, and M.A. Peñalva, *Receptor-independent Ambient pH signaling by ubiquitin attachment to fungal arrestin-like PalF*. J Biol Chem, 2010. **285**(23): p. 18095-102.
74. Hervás-Aguilar, A., et al., *Evidence for the Direct Involvement of the Proteasome in the Proteolytic Processing of the Aspergillus nidulans Zinc Finger Transcription Factor PacC*. J Biol Chem, 2007. **282**(48): p. 34735-34747.
75. Hettema, E.H., J. Valdez-Taubas, and H.R. Pelham, *Bsd2 binds the ubiquitin ligase Rsp5 and mediates the ubiquitination of transmembrane proteins*. EMBO J, 2004. **23**(6): p. 1279-88.
76. Hibbert, R.G., et al., *E3 ligase Rad18 promotes monoubiquitination rather than ubiquitin chain formation by E2 enzyme Rad6*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(14): p. 5590-5.
77. Hicke, L. and H. Riezman, *Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis*. Cell, 1996. **84**(2): p. 277-87.
78. Hochstrasser, M., et al., *The short-lived MAT α 2 transcriptional regulator is ubiquitinated in vivo*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 1991. **88**(11): p. 4606-4610.
79. Hochstrasser, M., *Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation*. Curr Opin Cell Biol, 1995. **7**(2): p. 215-23.
80. Hurley, J.H. and S.D. Emr, *THE ESCRT COMPLEXES: Structure and Mechanism of a Membrane-Trafficking Network**. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 2006. **35**(1): p. 277-298.
81. Ito, T., et al., *A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 2001. **98**: p. 4569-4574.
82. Katzmman, D.J., et al., *Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting*. The Journal of Cell Biology, 2003. **162**(3): p. 413-423.
83. Katzmman, D.J., M. Babst, and S.D. Emr, *Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I*. Cell, 2001. **106**: p. 145-155.
84. Kee, Y., N. Lyon, and J.M. Huibregtse, *The Rsp5 ubiquitin ligase is coupled to and antagonized by the Ubp2 deubiquitinating enzyme*. EMBO J, 2005. **24**(13): p. 2414-24.
85. Kim, H.C. and J.M. Huibregtse, *Polyubiquitination by HECT E3s and the determinants of chain type specificity*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(12): p. 3307-18.
86. Kim, H.C., et al., *Structure and function of a HECT domain ubiquitin-binding site*. EMBO Rep, 2011. **12**(4): p. 334-41.
87. Kim, J. and J.P. Hirsch, *A nucleolar protein that affects mating efficiency in Saccharomyces cerevisiae by altering the morphological response to pheromone*. Genetics, 1998. **149**(2): p. 795-805.
88. Kim, J., et al., *Structural basis for endosomal targeting by the Bro1 domain*. Dev Cell, 2005. **8**(6): p. 937-47.
89. Kim, Y.M., et al., *Regulation of Arrestin-3 Phosphorylation by Casein Kinase II*. J Biol Chem, 2002. **277**(19): p. 16837-16846.

Bibliografia

90. Klapisz, E., et al., *A ubiquitin-interacting motif (UIM) is essential for Eps15 and Eps15R ubiquitination*. J Biol Chem, 2002. **277**(34): p. 30746-53.
91. Kolling, R. and C.P. Hollenberg, *The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants*. EMBO J, 1994. **13**(14): p. 3261-71.
92. Kostelansky, M.S., et al., *Molecular architecture and functional model of the complete yeast ESCRT-I heterotetramer*. Cell, 2007. **129**(3): p. 485-98.
93. Kostelansky, M.S., et al., *Structural and functional organization of the ESCRT-I trafficking complex*. Cell, 2006. **125**(1): p. 113-26.
94. Krupnick, J.G., et al., *Arrestin/clathrin interaction. Localization of the clathrin binding domain of nonvisual arrestins to the carboxy terminus*. J Biol Chem, 1997. **272**(23): p. 15011-15016.
95. Kuhn, H., S.W. Hall, and U. Wilden, *Light-induced binding of 48-kDa protein to photoreceptor membranes is highly enhanced by phosphorylation of rhodopsin*. FEBS Lett, 1984. **176**(2): p. 473-8.
96. Kus, B.M., et al., *Functional interaction of 13 yeast SCF complexes with a set of yeast E2 enzymes in vitro*. Proteins, 2004. **54**(3): p. 455-67.
97. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
98. Langelier, C., et al., *Human ESCRT-II complex and its role in human immunodeficiency virus type 1 release*. J Virol, 2006. **80**(19): p. 9465-80.
99. Laporte, S.A., et al., *The interaction of β -arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of β 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits*. J Biol Chem, 2000. **275**(30): p. 23120-23126.
100. Lauwers, E., C. Jacob, and B. Andre, *K63-linked ubiquitin chains as a specific signal for protein sorting into the multivesicular body pathway*. J Cell Biol, 2009. **185**(3): p. 493-502.
101. Lauwers, E., et al., *The ubiquitin code of yeast permease trafficking*. Trends Cell Biol, 2010. **20**(4): p. 196-204.
102. Leabu, M., *Membrane fusion in cells: molecular machinery and mechanisms*. J Cell Mol Med, 2006. **10**(2): p. 423-7.
103. Lefkowitz, R.J. and E.J. Whalen, *β -arrestins: traffic cops of cell signaling*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(2): p. 162-8.
104. Lefkowitz, R.J., K. Rajagopal, and E.J. Whalen, *New Roles for [β]-Arrestins in Cell Signaling: Not Just for Seven-Transmembrane Receptors*. Molecular Cell, 2006. **24**(5): p. 643-652.
105. Li, W.S. and A.P. Mitchell, *Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth*. Genetics, 1997. **145**(1): p. 63-73.
106. Lin, C.H., et al., *Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface*. Cell, 2008. **135**(4): p. 714-25.
107. Lin, F.T., et al., *Phosphorylation of β -arrestin2 regulates its function in internalization of β (2)-adrenergic receptors*. Biochemistry, 2002. **41**(34): p. 10692-10699.

108. Lohse, M.J., et al., *β -Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function*. Science, 1990. **248**(4962): p. 1547-50.
109. Lucero, P., et al., *Monoubiquitination is sufficient to signal internalization of the maltose transporter in *Saccharomyces cerevisiae**. J Bacteriol, 2000. **182**(1): p. 241-3.
110. Luhtala, N. and G. Odorizzi, *Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes*. J Cell Biol, 2004. **166**(5): p. 717-29.
111. Luttrell, L.M. and D. Gesty-Palmer, *Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling*. Pharmacol Rev, 2010. **62**(2): p. 305-30.
112. Macgurn, J.A., et al., *TORC1 Regulates Endocytosis via Npr1-Mediated Phosphoinhibition of a Ubiquitin Ligase Adaptor*. Cell, 2011. **147**(5): p. 1104-17.
113. Malik, R. and A. Marchese, *Arrestin-2 interacts with the endosomal sorting complex required for transport machinery to modulate endosomal sorting of CXCR4*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(14): p. 2529-41.
114. Mao, Y., et al., *Crystal structure of the VHS and FYVE tandem domains of Hrs, a protein involved in membrane trafficking and signal transduction*. Cell, 2000. **100**(4): p. 447-56.
115. Marchese, A. and J.L. Benovic, *Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting*. J Biol Chem, 2001. **276**(49): p. 45509-12.
116. Marchese, A., et al., *The E3 ubiquitin ligase AIP4 mediates ubiquitination and sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4*. Dev Cell, 2003. **5**(5): p. 709-22.
117. Martin-Serrano, J., T. Zang, and P.D. Bieniasz, *HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress*. Nat Med, 2001. **7**(12): p. 1313-1319.
118. Miller, J.H., *Experiments in Molecular Genetics* 1972: Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY.
119. Moore, C.A., S.K. Milano, and J.L. Benovic, *Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins*. Annu Rev Physiol, 2007. **69**: p. 451-82.
120. Morita, E. and W.I. Sundquist, *Retrovirus budding*. Annu.Rev.Cell Dev.Biol., 2004. **20**(1): p. 395-425.
121. Nabhan, J.F., et al., *Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(11): p. 4146-51.
122. Nabhan, J.F., H. Pan, and Q. Lu, *Arrestin domain-containing protein 3 recruits the NEDD4 E3 ligase to mediate ubiquitination of the β 2-adrenergic receptor*. EMBO Rep, 2010. **11**(8): p. 605-11.
123. Nelson, C.D., et al., *Targeting of diacylglycerol degradation to M1 muscarinic receptors by β -arrestins*. Science, 2007. **315**(5812): p. 663-6.
124. Neves, S.R., P.T. Ram, and R. Iyengar, *G protein pathways*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1636-9.
125. Nikko, E. and B. Andre, *Evidence for a direct role of the Doa4 deubiquitinating enzyme in protein sorting into the MVB pathway*. Traffic, 2007. **8**(5): p. 566-581.
126. Nikko, E. and H.R. Pelham, *Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma membrane transporters*. Traffic, 2009. **10**(12): p. 1856-67.

Bibliografía

127. Nikko, E., J.A. Sullivan, and H.R. Pelham, *Arrestin-like proteins mediate ubiquitination and endocytosis of the yeast metal transporter Smf1*. EMBO Rep, 2008. **9**(12): p. 1216-21.
128. Nydegger, S., et al., *Mapping of tetraspanin-enriched microdomains that can function as gateways for HIV-1*. The Journal of Cell Biology, 2006. **173**(5): p. 795-807.
129. O'Donnell, A.F., et al., *Alpha-arrestins Aly1 and Aly2 regulate intracellular trafficking in response to nutrient signaling*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(20): p. 3552-66.
130. Oakley, R.H., et al., *Differential affinities of visual arrestin, β arrestin1, and β arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors*. J Biol Chem, 2000. **275**(22): p. 17201-10.
131. Obara, K., H. Yamamoto, and A. Kihara, *Membrane Protein Rim21 Plays a Central Role in Sensing Ambient pH in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 2012. **287**(46): p. 38473-81.
132. Odorizzi, G., et al., *Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Cell Science, 2003. **116**(10): p. 1893-1903.
133. Orejas, M., et al., *Activation of the Aspergillus PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety*. Genes Dev, 1995. **9**(13): p. 1622-32.
134. Palade, G.E., *Studies on the endoplasmic reticulum. II. Simple dispositions in cells in situ*. J Biophys Biochem Cytol, 1955. **1**(6): p. 567-82.
135. Papa, F.R. and M. Hochstrasser, *The yeast DOA4 gene encodes a deubiquitinating enzyme related to a product of the human tre-2 oncogene*. Nature, 1993. **366**: p. 313-319.
136. Peñalva, M.A. and H.N. Arst, Jr., *Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts*. Annual Review of Microbiology, 2004. **58**(1): p. 425-451.
137. Pelham, H.R., *Insights from yeast endosomes*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(4): p. 454-62.
138. Peñalva, M.A., et al., *Ambient pH gene regulation in fungi: making connections*. Trends Microbiol, 2008. **16**(6): p. 291-300.
139. Peñalva, M.A. and H.N. Arst, Jr., *Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts*. Microbiol.Mol.Biol.Rev., 2002. **66**: p. 426-446.
140. Perry, S.J., et al., *Targeting of cyclic AMP degradation to β 2-adrenergic receptors by β -arrestins*. Science, 2002. **298**(5594): p. 834-6.
141. Pfister, C., et al., *[Identification of the so-called 48 K protein that interacts with illuminated rhodopsin in retinal rods, and the retinal S antigen, inductor of experimental autoimmune uveoretinitis]*. C R Acad Sci III, 1984. **299**(8): p. 261-5.
142. Pierce, K.L., R.T. Premont, and R.J. Lefkowitz, *Seven-transmembrane receptors*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(9): p. 639-50.
143. Polo, S., et al., *A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins*. Nature, 2002. **416**(6879): p. 451-455.
144. Pornillos, O., et al., *HIV Gag mimics the Tsg101-recruiting activity of the human Hrs protein*. The Journal of Cell Biology, 2003. **162**(3): p. 425-434.

145. Pornillos, O., et al., *Structure of the Tsg101 UEV domain in complex with the PTAP motif of the HIV-1 p6 protein*. Nat.Struct.Biol., 2002. **9**(11): p. 812-817.
146. Prag, G., et al., *The Vps27/Hse1 complex is a GAT domain-based scaffold for ubiquitin-dependent sorting*. Dev Cell, 2007. **12**(6): p. 973-86.
147. Raiborg, C., et al., *Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(5): p. 394-8.
148. Ramanathan, H.N. and Y. Ye, *Cellular strategies for making monoubiquitin signals*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2012. **47**(1): p. 17-28.
149. Rauch, S. and J. Martin-Serrano, *Multiple interactions between the ESCRT machinery and arrestin-related proteins: implications for PPXY-dependent budding*. J Virol, 2011. **85**(7): p. 3546-56.
150. Raymond, C.K., et al., *Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants*. Mol Biol Cell, 1992. **3**(12): p. 1389-402.
151. Reggiori, F. and H.R. Pelham, *A transmembrane ubiquitin ligase required to sort membrane proteins into multivesicular bodies*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(2): p. 117-23.
152. Ren, X. and J.H. Hurley, *Structural basis for endosomal recruitment of ESCRT-I by ESCRT-0 in yeast*. EMBO J, 2011. **30**(11): p. 2130-9.
153. Ren, X.R., et al., *Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and β -arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(5): p. 1448-53.
154. Rodriguez-Galan, O., et al., *Physiological Involvement in pH Signaling of Vps24-mediated Recruitment of Aspergillus PalB Cysteine Protease to ESCRT-III*. J Biol Chem, 2009. **284**(7): p. 4404-4412.
155. Rothfels, K., et al., *Components of the ESCRT pathway, DFG16, and YGR122w are required for Rim101 to act as a corepressor with Nrg1 at the negative regulatory element of the DIT1 gene of Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and Cellular Biology, 2005. **25**(15): p. 6772-6788.
156. Rubin, D.M. and D. Finley, *Proteolysis. The proteasome: a protein-degrading organelle?* Curr Biol, 1995. **5**(8): p. 854-8.
157. Ruden, D.M., et al., *Generating yeast transcriptional activators containing no yeast protein sequences*. Nature, 1991. **350**: p. 250-252.
158. Ruiz, A. and J. Arino, *Function and regulation of the Saccharomyces cerevisiae ENA sodium ATPase system*. Eukaryot Cell, 2007. **6**(12): p. 2175-83.
159. Saeki, Y., et al., *Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome*. EMBO J, 2009. **28**(4): p. 359-71.
160. Saksena, S., et al., *ESCRTing proteins in the endocytic pathway*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(12): p. 561-73.
161. Saksena, S., et al., *Functional Reconstitution of ESCRT-III Assembly and Disassembly*. Cell, 2009. **136**(1): p. 97-109.
162. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis., *Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1989.

163. Samson, R.Y., et al., *Molecular and structural basis of ESCRT-III recruitment to membranes during archaeal cell division*. Mol Cell, 2011. **41**(2): p. 186-96.
164. Scott, A., et al., *Structural and mechanistic studies of VPS4 proteins*. EMBO J, 2005. **24**(20): p. 3658-69.
165. Shenoy, S.K. and R.J. Lefkowitz, *β -Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction*. Trends Pharmacol Sci, 2011. **32**(9): p. 521-33.
166. Shenoy, S.K. and R.J. Lefkowitz, *Receptor-specific ubiquitination of β -arrestin directs assembly and targeting of 7TM receptor-signalosomes*. J Biol Chem, 2005: p. M412418200.
167. Shenoy, S.K. and R.J. Lefkowitz, *Trafficking Patterns of β -Arrestin and G Protein-coupled Receptors Determined by the Kinetics of β -Arrestin Deubiquitination*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 14498-14506.
168. Shenoy, S.K., et al., *β -arrestin-dependent signaling and trafficking of 7-transmembrane receptors is reciprocally regulated by the deubiquitinase USP33 and the E3 ligase Mdm2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(16): p. 6650-5.
169. Shenoy, S.K., et al., *Nedd4 mediates agonist-dependent ubiquitination, lysosomal targeting and degradation of the β_2 adrenergic receptor*. J Biol Chem, 2008. **283**(22166): p. 22176.
170. Shenoy, S.K., et al., *Nedd4 mediates agonist-dependent ubiquitination, lysosomal targeting, and degradation of the β_2 -adrenergic receptor*. J Biol Chem, 2008. **283**(32): p. 22166-76.
171. Shenoy, S.K., et al., *Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated β_2 -adrenergic receptor and β -arrestin*. Science, 2001. **294**(5545): p. 1307-13.
172. Shenoy, S.K., et al., *Ubiquitination of β -arrestin links seven-transmembrane receptor endocytosis and ERK activation*. J Biol Chem, 2007. **282**(40): p. 29549-62.
173. Shi, H., et al., *The retromer subunit Vps26 has an arrestin fold and binds Vps35 through its C-terminal domain*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(6): p. 540-8.
174. Shih, S.C., et al., *Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that function in receptor endocytosis*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(5): p. 389-93.
175. Sikorski, R.S. and P. Hieter, *A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae**. Genetics, 1989. **122**(1): p. 19-27.
176. Slagsvold, T., et al., *Eap45 in mammalian ESCRT-II binds ubiquitin via a phosphoinositide-interacting GLUE domain*. J Biol Chem, 2005. **280**(20): p. 19600-6.
177. Slagsvold, T., et al., *Endosomal and non-endosomal functions of ESCRT proteins*. Trends Cell Biol, 2006. **16**(6): p. 317-26.
178. Song, W. and M. Carlson, *Srb/mediator proteins interact functionally and physically with transcriptional repressor Sfl1*. EMBO J, 1998. **17**(19): p. 5757-65.
179. Sotelo, J.R., *An electron microscope study on the cytoplasmic and nuclear components of rat primary oocytes*. Z Zellforsch Mikrosk Anat, 1959. **50**: p. 749-65.
180. Springael, J.Y. and B. Andre, *Nitrogen-regulated ubiquitination of the Gap1 permease of *Saccharomyces cerevisiae**. Molecular Biology of the Cell, 1998. **9**(6): p. 1253-1263.

181. Storez, H., et al., *Homo- and hetero-oligomerization of β -arrestins in living cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(48): p. 40210-5.
182. Strohlic, T.I., et al., *Opposing activities of the Snx3-retromer complex and ESCRT proteins mediate regulated cargo sorting at a common endosome*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(11): p. 4694-706.
183. Subramanian, S., et al., *cis- and trans-acting localization determinants of pH response regulator Rim13 in *Saccharomyces cerevisiae**. Eukaryot Cell, 2012. **11**(10): p. 1201-9.
184. Teis, D., S. Saksena, and S.D. Emr, *SnapShot: the ESCRT machinery*. Cell, 2009. **137**(1): p. 182-182 e1.
185. Teo, H., D.B. Veprintsev, and R.L. Williams, *Structural insights into endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) recognition of ubiquitinated proteins*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(27): p. 28689-28696.
186. Teo, H., et al., *ESCRT-I core and ESCRT-II GLUE domain structures reveal role for GLUE in linking to ESCRT-I and membranes*. Cell, 2006. **125**(1): p. 99-111.
187. Teo, H., et al., *ESCRT-II, an endosome-associated complex required for protein sorting: crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes*. Dev Cell, 2004. **7**(4): p. 559-69.
188. Terrell, J., et al., *A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor*. Molecular Cell, 1998. **1**(2): p. 193-202.
189. Tilburn, J., et al., *Mutational analysis of the pH signal transduction component PalC of *Aspergillus nidulans* supports distant similarity to BRO1 domain family members*. Genetics, 2005. **171**(1): p. 393-401.
190. Tobin, A.B., A.J. Butcher, and K.C. Kong, *Location, location, location...site-specific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signalling*. Trends Pharmacol Sci, 2008. **29**(8): p. 413-20.
191. Treton, B., et al., *Ambient pH signalling in ascomycetous yeasts involves homologues of the *Aspergillus nidulans* genes *palF* and *palH**. Mol Gen.Genet., 2000. **263**(3): p. 505-513.
192. Tyers, M., et al., *The Cln3-Cdc28 kinase complex of *S. cerevisiae* is regulated by proteolysis and phosphorylation*. EMBO J, 1992. **11**(5): p. 1773-1784.
193. Varadan, R., et al., *Solution conformation of Lys63-linked di-ubiquitin chain provides clues to functional diversity of polyubiquitin signaling*. J Biol Chem, 2004. **279**(8): p. 7055-63.
194. Varadan, R., et al., *Structural properties of polyubiquitin chains in solution*. J Mol Biol, 2002. **324**(4): p. 637-47.
195. Vincent, O., et al., *YPXL/I is a protein interaction motif recognized by aspergillus PalA and its human homologue, AIP1/Alix*. Molecular and Cellular Biology, 2003. **23**(5): p. 1647-1655.
196. Wacker, W.B., et al., *Experimental allergic uveitis. Isolation, characterization, and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina*. J Immunol, 1977. **119**(6): p. 1949-58.
197. Whalen, E.J., S. Rajagopal, and R.J. Lefkowitz, *Therapeutic potential of β -arrestin- and G protein-biased agonists*. Trends Mol Med, 2011. **17**(3): p. 126-39.
198. Wilden, U., S.W. Hall, and H. Kuhn, *Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(5): p. 1174-8.

Bibliografia

199. Wise, A., K. Gearing, and S. Rees, *Target validation of G-protein coupled receptors*. Drug Discov Today, 2002. **7**(4): p. 235-46.
200. Woelk, T., et al., *Molecular mechanisms of coupled monoubiquitination*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(11): p. 1246-54.
201. Xiao, K., et al., *Activation-dependent conformational changes in β -arrestin 2*. J Biol Chem, 2004. **279**(53): p. 55744-53.
202. Xiao, K., et al., *Functional specialization of β -arrestin interactions revealed by proteomic analysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(29): p. 12011-6.
203. Xu, W. and A.P. Mitchell, *Yeast PalA/AIP1/Alix homolog Rim20p associates with a PEST-like region and is required for its proteolytic cleavage*. J.Bacteriol., 2001. **183**: p. 6917-6923.
204. Xu, W., et al., *Multivesicular body-ESCRT components function in pH response regulation in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans**. Molecular Biology of the Cell, 2004. **15**(12): p. 5528-5537.
205. Ye, Y. and M. Rape, *Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(11): p. 755-64.
206. Yu, Z., et al., *Cryo-EM structure of dodecameric Vps4p and its 2:1 complex with Vta1p*. J Mol Biol, 2008. **377**(2): p. 364-77.
207. Zhang, J., et al., *Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/ β -arrestin endocytic complexes*. J Biol Chem, 1999. **274**(16): p. 10999-1006.
208. Zhang, P., et al., *The ubiquitin ligase itch regulates apoptosis by targeting thioredoxin-interacting protein for ubiquitin-dependent degradation*. J Biol Chem, 2010. **285**(12): p. 8869-79.

Anexo.

Los siguientes artículos se han derivado del trabajo experimental realizado en esta tesis. El primero fue publicado en 2010 y dio lugar, junto con otros trabajos, a la revisión que se presenta en segundo lugar.

Recruitment of the ESCRT Machinery to a Putative Seven-Transmembrane-Domain Receptor Is Mediated by an Arrestin-Related Protein[∇]

Antonio Herrador, Silvia Herranz, David Lara, and Olivier Vincent*

Instituto de Investigaciones Biomédicas CSIC-UAM, 28029 Madrid, Spain

Received 29 January 2009/Returned for modification 20 April 2009/Accepted 8 December 2009

Mammalian arrestins have a major role in the intracellular trafficking of seven-transmembrane (7TM) receptors. The fungal ambient pH signaling pathway involves an arrestin-related protein, PalF/Rim8, and the ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) machinery. We found that in *Saccharomyces cerevisiae*, Rim8 binds to both the putative 7TM pH sensor Rim21 and the ESCRT-I subunit Vps23. We show that an SXP motif in Rim8 mediates binding to the Vps23 ubiquitin E2 variant (UEV) domain and that a monoubiquitinated residue near the SXP motif contributes to this interaction. We present evidence that Rim8 ubiquitination is dependent on the Rsp5 E3 ubiquitin ligase and triggered upon binding of Vps23 UEV to both the SXP motif and ubiquitin, thus suggesting a two-step binding mechanism. We further show that Rim8 coimmunoprecipitates with ESCRT-I subunits Vps23 and Vps28, supporting the idea that binding of Rim8 to Vps23 mediates the association of Rim8 with the ESCRT-I complex. Fluorescence microscopic analyses indicate that overexpressed Rim8 and Vps23 colocalize at cortical punctate structures, providing additional evidence of the interaction between these two proteins. Strikingly, our findings indicate that evolutionary conserved mechanisms control the recruitment of the ESCRT machinery to Pal/Rim proteins in fungi and retroviral Gag proteins in animal cells.

Arrestins play an essential role in the regulation of seven-transmembrane (7TM) receptors (31). Although initially identified on the basis of their ability to uncouple 7TM receptors from heterotrimeric G proteins in a process known as desensitization, arrestins were later found to serve as endocytic adaptors that recruit clathrin and the clathrin adaptor protein AP-2 and facilitate 7TM receptor internalization via clathrin-coated vesicles (17, 29, 30).

Until recently, arrestins were thought to be restricted to the animal kingdom. However, the identification of an arrestin-related protein in *Aspergillus nidulans*, PalF, demonstrated that members of this protein family are also present in fungi (22). PalF and its yeast homolog Rim8 are involved in the Pal/Rim signaling pathway, which mediates the ambient pH response and is activated in neutral-alkaline environments (41). As mammalian beta-arrestins, PalF, which contains arrestin N-terminal and C-terminal domains, binds to the cytoplasmic domain of a 7TM protein, the putative pH sensor PalH, and is ubiquitinated in a signal- and 7TM receptor-dependent manner (22).

The PalF/Rim8 signaling function does not appear to be related to receptor desensitization, as there is no evidence of G protein involvement in the Pal/Rim pathway. However, evidence strongly suggests that these proteins, as mammalian β -arrestins, play a role as endocytic adaptors. Most of the components of the ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) machinery involved in the MVB (mul-

tivesicular body) sorting pathway (24, 48), play an essential role in the Pal/Rim signaling pathway (4, 7, 12, 15, 20, 28, 43, 45, 62). According to the current model for the Rim pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, the ESCRT-I and ESCRT-II complexes, together with the Snf7 and Vps20 subunits of ESCRT-III, act downstream of a plasma membrane complex containing the two 7TM proteins Rim21 and Dfg16, Rim8, and probably the 3TM protein Rim9 (41). The prevailing view is that pH signaling requires Rim8-mediated endocytic internalization of Rim21 and/or Dfg16, thus making the connection between the plasma membrane complex and the endosomal ESCRT machinery. Snf7, which oligomerizes upon membrane binding (1, 47, 53), would serve as a docking platform for recruitment of a protein complex that triggers the pH-dependent proteolytic activation of the Rim101 transcription factor by the Rim13 cysteine protease. Rim20, a Bro1 domain-containing protein, mediates the recruitment of Rim101 to Snf7 (61), and evidence suggests that this interaction is a regulated step in the pathway (8).

An important question concerns the molecular mechanisms by which the pH signal is transmitted from the 7TM protein-arrestin complex to the ESCRT-associated Rim101-processing machinery. Intriguingly, Vps27, which mediates the recruitment of ESCRT-I to endocytic cargos, is not required for pH signal transduction, suggesting that a Rim pathway-specific protein may substitute Vps27 for ESCRT-I recruitment (45, 62).

Here, we present genetic and biochemical evidence that in *S. cerevisiae*, the arrestin-related protein Rim8 mediates the recruitment of ESCRT-I to the 7TM protein Rim21. Rim8 binds to both Rim21 and the ESCRT-I subunit Vps23, and we present evidence that an SXP motif and a monoubiquitinated residue in Rim8 contribute to binding to the Vps23 UEV domain. We show that Rim8 ubiquitination is dependent on

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Investigaciones Biomédicas CSIC-UAM, Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain. Phone: 34 915854495. Fax: 34 915854401. E-mail: ovincent@iib.uam.es.

[∇] Published ahead of print on 22 December 2009.

the E3 ubiquitin (Ub) ligase Rsp5, which binds a PXY motif in Rim8. We further show that Rim8 associates with both ESCRT-I subunits Vps23 and Vps28 in yeast extracts and that overexpressed Rim8 and Vps23 colocalize at cortical punctate structures. Our results, therefore, identify a protein of the arrestin family as an adaptor for the recruitment of the ESCRT machinery to a 7TM protein.

MATERIALS AND METHODS

Strains and genetic methods. The *Saccharomyces cerevisiae* strains were MHY501 (*MAT α* *DOA4* *his3 Δ 200* *leu2-3,112* *ura3-52* *lys2-801* *trp1-1*) and the isogenic *doa4::LEU2* derivative MHY623 (40), 23346c (*MAT α* *ura3*), and its isogenic derivative 27038a (*MAT α* *ura3* *npi1*) (21). The strain Y00000 (BY4741; *MAT α* *his3 Δ 1* *leu2 Δ 0* *met15 Δ 0* *ura3 Δ 0*) and isogenic derivatives Y04414 (*rim8 Δ*), Y01150 (*rim21 Δ*), Y11806 (*dfg16 Δ*), Y06196 (*rim9 Δ*), Y03416 (*vps23 Δ*), Y07333 (*rim20 Δ*), Y04752 (*ygr122w Δ*), Y00936 (*rim101 Δ*), and Y06643 (*rim13 Δ*) were obtained from Euroscarf (Frankfurt, Germany). The OVY25 strain expressing hemagglutinin (HA)-tagged RIM101 and the OVY121 strain expressing Flag-tagged VPS28 were constructed by transforming Y04414 (*rim8 Δ*) with a fragment of plasmid pKR41 and a PCR fragment generated from plasmid pFA6a-6xGLY-3xFLAG-HIS3MX6 (Addgene plasmid 20753), respectively, as previously described (14, 45). CTY10.5d (*MAT α* *ade2-101* *his3 Δ 200* *leu2- Δ 1* *trp1- Δ 901gal4* *gal80* *URA3::lexAop-lacZ*) (3) and W303-1A (*MAT α* *trp1-1* *leu2-3,112* *his3-11,15* *ura3-1* *ade2-1* *can1-100*) were used for two-hybrid and fluorescence microscopy experiments, respectively. Standard genetic methods were followed, and yeast cultures were grown in synthetic dextrose (SD) medium lacking appropriate amino acids to maintain selection for plasmids (44). Growth tests on yeast extract-peptone-dextrose (YPD) plates containing 200 mM LiCl have been described elsewhere (15).

Plasmids. Plasmids encoding Gal4 activation domain (GAD)-Vps23 and GAD-Rim21Cterm were constructed by cloning the Vps23 open reading frame (ORF) or the Rim21 C-terminal cytoplasmic tail (codons 327 to 534) in the polylinker of pACT2 (Clontech). Plasmids encoding glutathione S-transferase (GST)-Vps23 and GST-Rsp5WW are derivatives of pGEX-5X-1 (Pharmacia) containing the Vps23 ORF and the Rsp5 WW domains (codons 228 to 430), respectively. pADH1-HA-Vps23UEV is a derivative of pWS93 (50) containing the Vps23 UEV domain (codons 1 to 161). Vps23 mutations resulting in a Ser162Stop substitution in GAD-Vps23 and GST-Vps23 and in a Ser55Ala Asp56Ala Gly57Ala triple substitution in GAD-Vps23 and HA-Vps23UEV were obtained by using mutagenic PCR. pVps23-Flag and pVps23-RFP, encoding phenotypically wild-type (WT) (data not shown) Flag- or red fluorescent protein (RFP)-tagged Vps23 under the control of its native promoter, are derivatives of the centromeric plasmid pRS316 and the 2 μ m high-copy-number plasmid pRS424 (49), respectively. A NotI site was engineered immediately 5' of the stop codon of the Vps23 coding sequence, with a 367-bp 5' sequence and a 128-bp 3' sequence. This site was used to introduce a double-stranded oligonucleotide containing a triple Flag tag or a NotI fragment containing the mCherry RFP sequence. Plasmids encoding LexA-Rim8 and LexA-Rim8(528-542) or 3MYC-Rim8 and 3MYC-Rim8(461-542) were constructed by cloning the corresponding Rim8 coding sequence in pLexA(1-202)+PL (46) or pGBKT7 (Clontech). pFlag-Rim8, pHA-Rim8, and pRim8-HA, encoding phenotypically WT (data not shown) Flag- or HA-tagged Rim8 under the control of its native promoter are derivatives of the centromeric plasmid pRS313 (49) containing the Rim8 coding sequence with a 1,000-bp 5' sequence and a 427-bp 3' sequence. For pHA-Rim8 and pFlag-Rim8, a NotI site was engineered after Rim8 codon 178 and was used to introduce a NotI fragment from pGTEP1 (56) containing a triple HA tag or a double-stranded oligonucleotide containing a triple Flag tag in a region of Rim8 corresponding to the loop connecting β strands 9 and 10 in bovine arrestin (22). The same procedure was used for pRim8-HA, except that the NotI site was created immediately 5' of the stop codon. pRim8-GFP, encoding phenotypically WT (data not shown) green fluorescent protein (GFP)-tagged Rim8, is a derivative of the 2 μ m high-copy-number plasmid pRS423 containing the same Rim8 fragment as pRim8-HA, except that the NotI fragment containing the triple HA tag was replaced by a NotI fragment from pSFGP1 (27) containing the GFP sequence. pHA-Rim8(U) and pRim8-HA(U) were obtained by cloning the HA-Rim8- or Rim8-HA-containing fragments from pHA-Rim8 or pRim8-HA in pRS316. Rim8 mutations resulting in Pro506Ala, Lys521Arg, Lys527Arg, Pro536Leu, and Val505Stop substitutions or in a Glu533Ala Ser534Ala Asp535Ala Pro536Ala quadruple substitution were obtained by using mutagenic PCR. To construct the plasmid encoding the Flag-Rim8(1-504)-Vps23 chimeric

protein, a NcoI site was engineered after Rim8 codon 504 in pFlag-Rim8 and used to introduce the Vps23 coding sequence. YEp96 (2 μ m *TRP1* Ub) and YEp112 (2 μ m *TRP1* HA-Ub) contain synthetic yeast Ub and HA-tagged Ub under the control of the copper-inducible *CUP1* promoter, respectively (23). pCUP1-Ub0K was constructed by replacing the BamHI-KpnI Ub fragment in Yep96 with a fragment from LHP306 containing Ub-no Lys (55). pLGn+3xNRE22D carries a *CYC1-NRE-lacZ* reporter (45).

β -Galactosidase assays. For two-hybrid analysis, transformants were grown to mid-log phase in a selective SD medium. β -Galactosidase was quantitatively assayed in permeabilized yeast cells grown to mid-log phase in a selective SD medium and expressed in Miller units (35). For analysis of the *CYC1-NRE-lacZ* reporter, transformants were grown in a selective SD medium containing 0.1 M HEPES titrated to pH 7.0 and β -galactosidase activity was assayed with protein extracts prepared by cell disruption with glass beads and normalized to the protein concentration of the extract (18).

Immunoblot analysis. Yeast protein extracts were prepared from transformants grown to mid-log phase in a selective SD medium (final pH value, 3.5) and shifted to pH 7 for 30 min by adding 10 mM KOH to activate the Rim pathway. When indicated, protein extracts were prepared before the shift. Protein extracts for Rim101-HA and Flag-Rim8 immunoblot analysis were prepared by a rapid boiling method (57). Protein extracts for HA-tagged Rim8 and Vps23 immunoblot analysis were prepared with immunoprecipitation (IP) buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 1 mM dithiothreitol [DTT], 10% glycerol, 5 mM N-ethylmaleimide, Complete protease inhibitor mixture [Roche]), as described previously for immunoprecipitation assays (57), or by alkaline lysis (59) when indicated. Immunoprecipitation procedures were essentially as described previously (57). Protein lysates (300 to 400 μ g) were incubated with 20 μ l of anti-HA (Roche) or anti-Flag (Sigma) affinity matrix for 1 h on a rotating wheel. Total (50 μ g, or 1×10^7 cell equivalents, for rapid boiling and alkaline lysis) and immunoprecipitated extracts were analyzed by 7.5% SDS-PAGE and immunoblotting with monoclonal anti-HA (3F10; Roche) or anti-Flag (M2; Sigma) antibodies (Abs). Antibodies were detected by enhanced chemiluminescence with ECL Plus reagents (Amersham).

Pulldown assays. Recombinant GST-Vps23, GST-Vps23UEV, and GST-Rsp5WW were purified from *Escherichia coli* BL21 (Novagen) as described previously (58). [35 S]MYC-tagged Rim8, Rim8Cterm (codons 461 to 542), and Rim8 mutant derivatives were synthesized *in vitro* by using the Promega TNT system in the presence of [35 S]methionine [1,000 Ci/mmol (1 Ci = 37 GBq)]. Sepharose beads loaded with GST fusion proteins were incubated with 5 μ l of labeling reaction mixture for 1 h at 4°C in 500 μ l of STE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl) with 1% (vol/vol) Triton X-100, washed extensively with the same buffer, and boiled in the sample buffer. Bound proteins were separated by 10% SDS-PAGE and detected by autoradiography (labeled preys) or Coomassie staining (baits). For pulldown assays with yeast protein extracts, Sepharose beads loaded with GST fusion proteins were incubated in IP buffer with 250 μ g of protein lysates. Bound proteins were separated by 10% SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting. For quantitation of percent binding, several autoradiogram exposures of a gel were scanned as TIFF images and analyzed with ImageJ software.

Fluorescence microscopy. Yeast strains expressing GFP and RFP fusion proteins were grown to mid-log phase in a selective SD medium. Cells from 1-ml cultures were harvested by centrifugation and resuspended in ~100 μ l of the residual medium, and 2.5 μ l of the suspension was placed on a microscope slide. GFP and RFP localization in live cultures was monitored by direct fluorescence within 5 min. Cells were viewed using a Nikon Eclipse 90i fluorescence microscope. Images were captured with a DS-Qi1Mc digital camera (Nikon) using Nis elements BR 3.0 software and processed with ImageJ.

RESULTS

An SXP motif at the C terminus of Rim8 mediates its interaction with the ESCRT-I subunit Vps23. Signal transduction through the Pal/Rim pathway involves a 7TM receptor-arrestin complex and most of the components of the ESCRT machinery but not Vps27, which mediates the recruitment of ESCRT-I to endocytic cargos. We then tested whether the arrestin-related protein Rim8 could substitute Vps27 for recruitment of the ESCRT-I subunit Vps23. Two-hybrid assays revealed a strong interaction between a LexA-Rim8 fusion protein and a fusion of Vps23 to the Gal4 activation domain

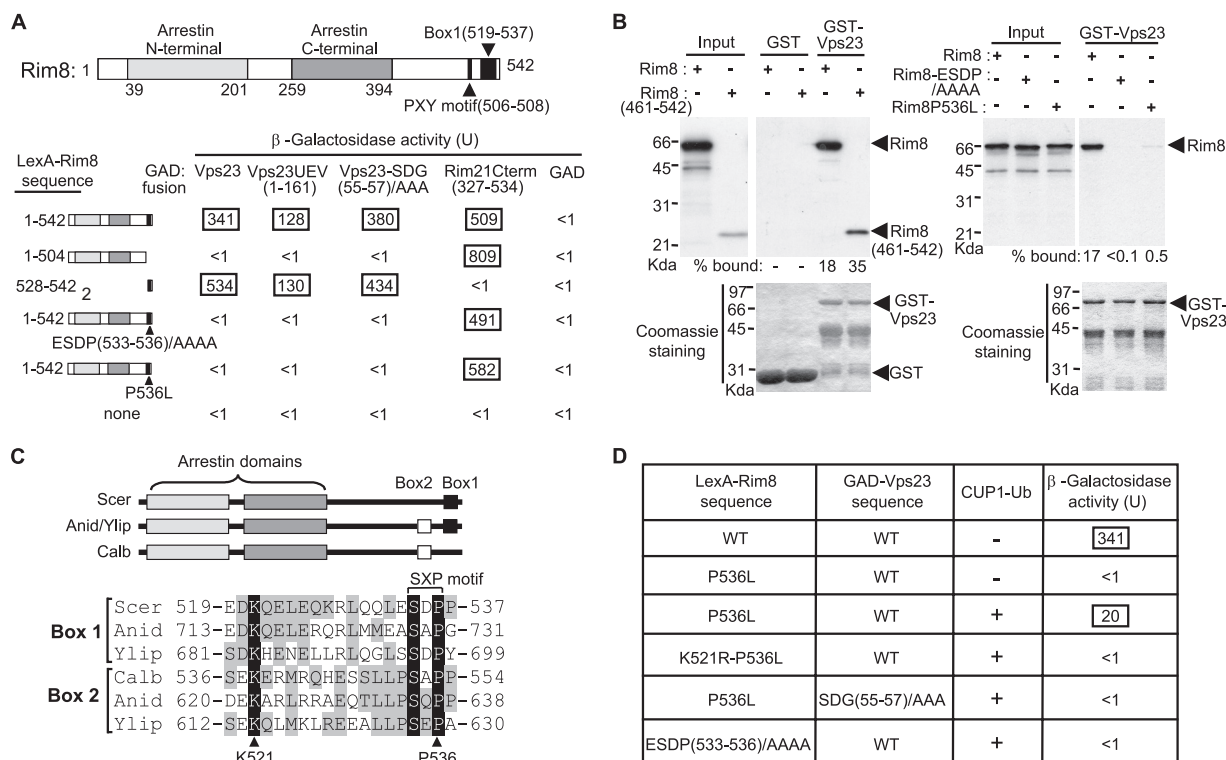


FIG. 1. Interaction of Rim8 with Rim21 and Vps23. (A) Two-hybrid mapping of the Rim8-interacting domains. Shown at the top are positions of the arrestin N-terminal and C-terminal domains, a PXY motif, and the conserved box 1 sequence. LexA-Rim8 fusions containing the indicated Rim8 residues were tested for interaction with GAD-Vps23, GAD-Vps23UEV, GAD-Vps23-SDG(55-57)AAA, GAD-Rim21Cterm, or GAD alone. The strain was CTY10-5d. Values are average β -galactosidase activities for four transformants, and standard errors were $<18\%$. (B) *In vitro* binding of Rim8 to Vps23. GST-Vps23 or GST was immobilized on glutathione-Sepharose beads and incubated with *in vitro*-synthesized [35 S]Rim8 (the wild type or the indicated mutant derivatives) or [35 S]Rim8(461-542). Pulled down proteins were separated on 10% SDS-PAGE gel and detected by autoradiography (upper) and Coomassie staining (lower). "Input" represents *in vitro*-synthesized proteins used for binding experiments (20% of the total reaction mixture). The percentages of the input bound to GST-Vps23 are indicated. (C) Conservation of box 1 and box 2 sequences in Rim8 family members. Shown at the top is a schematic representation (not to scale) showing the positions of arrestin domains and box 1 and box 2 sequences in Rim8 in *S. cerevisiae* (Scer), *Y. lipolytica* (Ylip), and *C. albicans* (Calb) and PalF in *A. nidulans* (Anid). The alignment shows the related conserved sequences in box 1 and box 2. Fully conserved (black shading) or similar (BLOSUM62; gray shading) residues are shown. The positions of the highly conserved K521 and P536 residues are indicated. (D) Ubiquitin-mediated interaction of Rim8 with Vps23. LexA-Rim8 fusions containing the indicated mutations were tested for two-hybrid interaction in strain CTY10-5d with GAD-Vps23 and the SDG(55-57)AAA mutant derivative in the presence of Yep96 (+) or vector control pRS424 (-). Transformants were grown in the presence of 100 μ M CuSO₄ to overexpress Ub from the *CUP1* promoter in Yep96. Values are average β -galactosidase activities for four transformants, and standard errors were $<18\%$.

(GAD) (Fig. 1A). Our previous work showed that the Rim8 homolog in *A. nidulans*, PalF, binds directly to the C-terminal cytoplasmic tail of the 7TM protein PalH (22). This interaction is conserved in yeast, as we detected a strong two-hybrid binding between Rim8 and the C-terminal cytoplasmic tail of Rim21 (codons 327 to 534), one of the two PalH homologs in *S. cerevisiae* (Fig. 1A). Thus, Rim8 interacts with both the 7TM protein Rim21 and the ESCRT-I subunit Vps23. Rim8 binds directly to Vps23, as shown by GST pulldown assays with purified, bacterially expressed GST-Vps23 as bait and *in vitro*-synthesized ³⁵S-labeled Rim8 (Fig. 1B).

Multiple sequence alignment of Rim8 family members did not reveal regions of sequence conservation outside the arrestin domains, with the exception of a short sequence (box 1) at the C terminus of Rim8 in *S. cerevisiae* (Fig. 1C). A related sequence (box 2) is found in *Candida albicans*, whereas both boxes 1 and 2 are present in *A. nidulans* and *Yarrowia lipolytica*. The C-terminal region of Rim8, containing box 1, is necessary

(Fig. 1A) and sufficient (Fig. 1B) for interaction with Vps23. In contrast, the C terminus of Rim8 is not required for binding to the 7TM protein Rim21 (Fig. 1A), as expected from the direct involvement of arrestin domains in the interaction between Rim8 and Rim21 homologs in *A. nidulans* (22). Furthermore, the Vps23 UEV domain (codons 1 to 161) is sufficient for interaction with Rim8 (Fig. 1A).

Previous studies showed that Vps23 UEV interacts with PSDP and PTVP motifs in Vps27 (6, 26). Rim8 box 1 contains a highly conserved SXP motif (SDP; codons 534 to 536) corresponding to a PSXP motif in box 2 (Fig. 1C). We showed that the 15 C-terminal residues of Rim8 (codons 528 to 542), containing the SXP motif, are sufficient for interaction with Vps23 (Fig. 1A) and that substitution of four alanine residues in place of the ESDP sequence (codons 533 to 536) containing the SXP motif abolished both two-hybrid interaction and *in vitro* binding between Rim8 and Vps23 (Fig. 1A and B). As expected, the ESDP/AAAA substitution did not impair the interaction

between Rim8 and the 7TM protein Rim21 (Fig. 1A). A previous study showed that binding of the mammalian Vps23 homolog, Tsg101, to the related P(T/S)AP motif in the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag protein is strongly dependent on the second Pro residue in this motif, as its replacement by a Leu residue significantly reduced Tsg101 UEV binding (16). We found that Rim8-Vps23 two-hybrid interaction was also disrupted upon replacement of the Pro536 residue with Leu in the SXP motif (Fig. 1A). However, in contrast to the ESDP(533-536)/AAAA mutation, the Pro536Leu substitution allowed some residual binding to Vps23 in pulldown assays (Fig. 1B), thus suggesting that this mutation does not fully inactivate the SXP motif. Together, these findings indicate that the conserved SXP motif in Rim8 box 1 is a Vps23-binding site.

The Rim8 C terminus is monoubiquitinated at residue K521. Rim8 box 1 contains a highly conserved Lys residue (K521) located 12 residues upstream of the SXP motif (Fig. 1C). Because the Rim8 homolog in *A. nidulans* is ubiquitinated (22), we wondered whether K521 might be a ubiquitination site. To test whether Rim8 is ubiquitinated, we examined by immunoblot analysis either Flag- or HA-tagged Rim8, expressed from its own promoter, on a centromeric plasmid. Anti-Flag immunoblot analysis of Flag-tagged Rim8 immunoprecipitates detected a major band migrating at 82 kDa and a minor band of lower-level mobility (Fig. 2A, upper panel, lane 1). We showed that the band of lower-level mobility markedly increases and is up-shifted upon overexpression of HA-tagged Ub (Fig. 2A, upper panel, lane 2). This band corresponds to an HA-Ub conjugate as it yields detectable HA immunoreactivity (Fig. 2A, lower panel). Thus, Rim8, as PalF of *A. nidulans*, is ubiquitinated. Unexpectedly, we found that Rim8, in contrast to PalF, is ubiquitinated in a pH signal-independent manner (Fig. 2B), although increased ambient pH activates the Rim pathway leading to Rim101 processing (Fig. 2C). In addition, ubiquitinated Rim8 levels remained unchanged over 3 h following a shift from either pH 3.5 to pH 7 or pH 7 to pH 3.5 (data not shown).

A previous study showed that the pool of free Ub in the cell, which is depleted in a *doa4Δ* mutant, can be restored to wild-type levels by expressing Ub under the *CUP1* promoter without adding extra copper to the medium (38). In agreement with this study, immunoblot analysis of HA-Rim8 showed that ubiquitinated Rim8 is undetectable in a *doa4Δ* mutant and restored upon expression of Ub from the *CUP1* promoter in the absence of extra copper (Fig. 2D, upper panel, lanes 2 and 3). The same result was obtained when Ub lacking all of its Lys residues (Ub0K), which prevents the formation of polyubiquitin chains, was expressed (Fig. 2D, upper panel, lane 4), indicating that the band of lower-level mobility detected in the wild-type strain represents monoubiquitinated Rim8. Control experiments showed that overexpression of Ub upon addition of extra copper to the medium results in the formation of an additional band, which is not detected when Ub0K is overexpressed (Fig. 2D, lower panel, lanes 3 and 4). This band is presumed, owing to its size, to be diubiquitinated Rim8, which is consistent with the previously reported accumulation of di-Ub species upon Ub overexpression in a *doa4Δ* mutant (38). We next examined whether the conserved K521 residue in Rim8 box 1 is involved in Rim8 ubiquitination. Immunoblot analysis of HA-Rim8 showed that a Lys521Arg

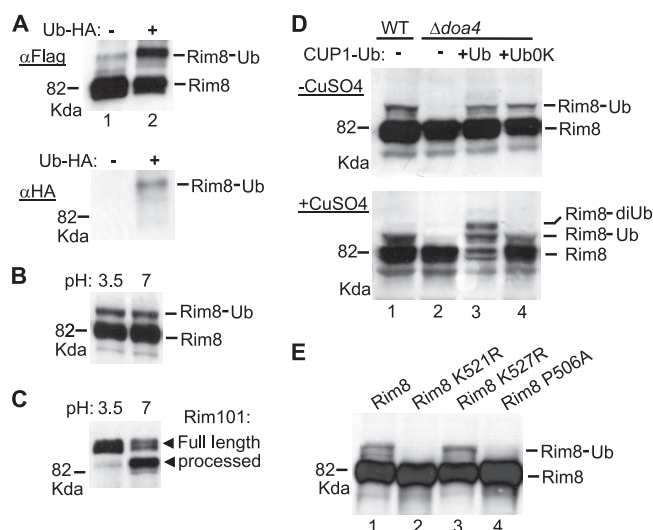


FIG. 2. Monoubiquitination of Rim8 at K521. (A to E) Western blot analysis of epitope-tagged Rim8. The position of ubiquitinated Rim8 (Ub) is indicated. (A) MYH501 (WT) was cotransformed with pFlag-Rim8 and either Yep112 (+) or vector control pRS424 (-) and grown in the presence of 100 μM CuSO₄ to overexpress HA-tagged Ub from the *CUP1* promoter in Yep112. Anti-Flag (αFlag)-immunoprecipitated protein extracts were immunoblotted with anti-Flag (upper panel) or anti-HA (lower panel) Ab. (B) Y04414 (*rim8Δ*) was transformed with pHA-Rim8, and protein extracts made by alkaline lysis before and after a shift from pH 3.5 to pH 7 were immunoblotted with anti-HA Ab. (C) OY25 (*rim8Δ RIM101-HA*) was transformed with pFlag-Rim8, and protein extracts prepared before and after a shift from pH 3.5 to pH 7 were immunoblotted with anti-HA Ab. (D) MYH501 (WT) and MYH623 (*doa4Δ*) were cotransformed with pHA-Rim8 and Yep96 (+Ub), pCUP1-Ub0K (+Ub0K), or vector control pRS424 (-) and grown in the absence (upper) or presence (lower) of 100 μM CuSO₄ to modulate Ub expression from the *CUP1* promoter. Protein extracts were immunoblotted with anti-HA Ab. (E) Y04414 (*rim8Δ*) was transformed with plasmid pHA-Rim8 or the indicated mutant derivatives, and protein extracts were immunoblotted with anti-HA Ab.

substitution abolishes Rim8 ubiquitination (Fig. 2E, lane 2). As a control, substitution of a second Lys residue in Rim8 box 1, Lys527, had no effect (Fig. 2E, lane 3). Thus, Rim8 is monoubiquitinated at residue K521 within its C terminus.

Rim8 ubiquitination is dependent on the Rsp5 E3 Ub ligase, which binds a PXY motif in Rim8. Previous work showed that mammalian β-arrestin-1 interacts with AIP4/Itch, an E3 Ub ligase of the Nedd4 family, to regulate CXCR4 endosomal sorting (5). As Rim8 interacts with a component of the endosome-associated ESCRT machinery, we tested whether Rsp5, the only member of the Nedd4 family in yeast, is involved in Rim8 ubiquitination. Immunoblot analysis of HA-Rim8 shows that Rim8 ubiquitination is undetectable in the *npi* mutant (Fig. 3A), which produces very low levels of Rsp5 (51), suggesting that Rsp5 is responsible for Rim8 ubiquitination.

Rsp5 recognizes a large number of substrates through its WW domains (19). We showed that *in vitro*-synthesized, 35S-labeled Rim8 binds directly to a purified, bacterially expressed fusion of GST and the WW domains of Rsp5 (codons 228 to 430) in pulldown assays (Fig. 3B). Previous studies showed that Rsp5 WW domains bind to PPXY or PXY motifs (11). A PXY motif (PKY; codons 506 to 508), located 12 residues upstream

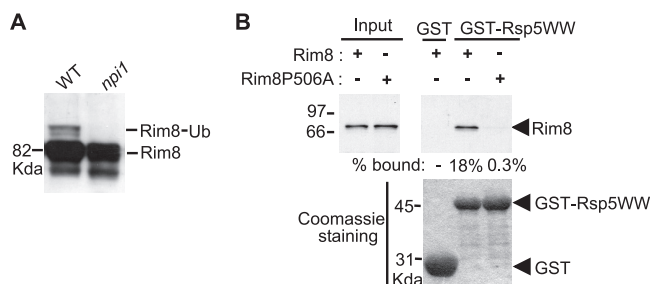


FIG. 3. The Rsp5 Ub ligase is required for Rim8 ubiquitination and binds a PXY motif at the Rim8 C terminus. (A) 23346c (WT) and 27038a (*npi1*) were transformed with pHA-Rim8(U), and protein extracts were immunoblotted with anti-HA Ab. (B) *In vitro* binding of Rim8 and Rim8-P506A to Rsp5 WW domains. GST-Rsp5WW or GST was immobilized on glutathione-Sepharose beads and incubated with *in vitro*-synthesized [35 S]Rim8 (the wild type or the P506A mutant). SDS-PAGE gel analysis of pulled down proteins was as described for Fig. 1B.

of the ubiquitinated Lys residue at the C terminus of Rim8 (Fig. 1A), is highly conserved in Rim8 homologs in other *Saccharomyces* species (data not shown). Binding of *in vitro*-synthesized Rim8 to GST-Rsp5WW was almost abolished by a Pro506Ala substitution in the PXY motif (Fig. 3B), suggesting that this motif mediates the direct interaction detected between these two proteins. To assess the physiological role of the PXY-mediated interaction between the Rim8 and Rsp5 WW domains, we tested the effect of the Pro506Ala substitution on Rim8 ubiquitination *in vivo*. Immunoblot analysis of HA-Rim8 shows that Rim8 ubiquitination was markedly reduced upon replacement of the Pro506 residue with Ala (Fig. 2E, lane 4), which is consistent with the idea that the PXY motif in Rim8 mediates a functional interaction with Rsp5 *in vivo*.

The SXP motif and the monoubiquitinated residue in Rim8 both contribute to binding to Vps23 *in vivo*. To address the physiological role of the monoubiquitinated residue and the SXP motif in Rim8, we examined the effect on Rim signaling of mutations inactivating one or both of these elements. In agreement with previous work (32, 45, 61), abrogation of Rim signaling in a *rim8Δ* mutant prevents processing of the Rim101 transcription factor (Fig. 4A, lane 3), repression of the Rim101-dependent reporter *CYC1-NRE-lacZ* (Fig. 4B, lane 3), and growth in the presence of lithium (Fig. 4C, lane 3). Truncation of the C terminus of Rim8 (codons 505 to 542), which contains the ubiquitination site and the SXP motif, resulted in a stringent loss of function phenotype *in vivo* (Fig. 4A, B, and C, lanes 2). The ESDP(533-536)/AAAA substitution, which eliminates the SXP motif and abolishes Vps23 binding, also produced a loss-of-function phenotype (Fig. 4A, B, and C, lanes 8), thus indicating that binding of Vps23 to the Rim8 SXP motif plays an essential role in Rim signal transduction. In contrast, the Pro536Leu substitution, which allows some residual binding to Vps23 (see above), or the Lys521Arg substitution, which inactivates the ubiquitination site, had no detectable effect on Rim8 function (Fig. 4A, B, and C, lanes 4 and 5). In agreement with these findings, inactivation of the PXY motif, which mediates the interaction with the Rsp5 Ub ligase, did not impair Rim signaling (data not shown). Strikingly, a

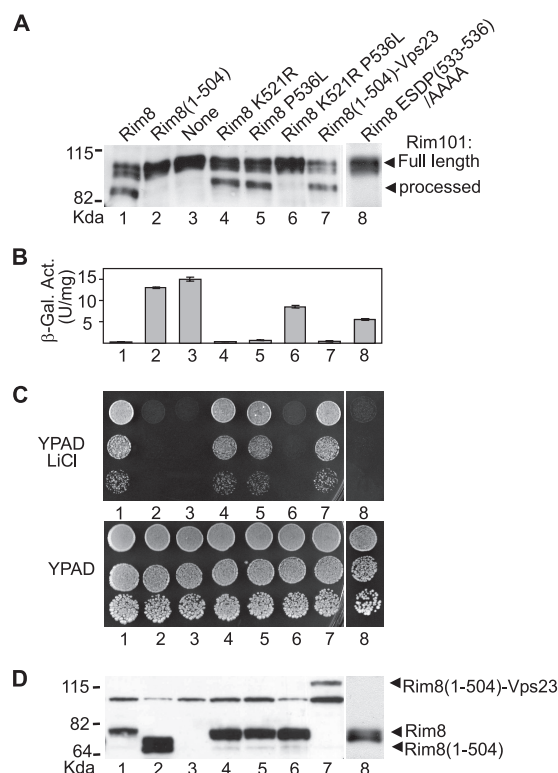


FIG. 4. Effects of Rim8 C-terminal mutations on Rim signaling. (A to C) Functional assays for testing whether plasmids carrying the indicated Flag-tagged *rim8* mutants can complement the *rim8* deletion in the genome. The plasmids used were pFlag-Rim8 (Rim8), vector control pRS313 (none), or the indicated pFlag-Rim8 mutant derivatives. (A) Processing of HA-tagged Rim101 in strain OVY25 (*rim8Δ RIM101-HA*) carrying the indicated pFlag-Rim8 plasmids (top). Protein extracts on an anti-HA immunoblot were analyzed to visualize Rim101-HA. The positions of the full-length and the processed forms of Rim101-HA are indicated. (B) Y04414 (*rim8Δ*) was cotransformed with the plasmid pLGN+3xNRE22D, carrying a *CYC1-NRE-lacZ* reporter, and the indicated pFlag-Rim8 plasmids (top). Values are average β-galactosidase activities for 2 transformants. (C and D) Y04414 (*rim8Δ*) was transformed with the indicated pFlag-Rim8 plasmids (top). (C) Transformants were grown to stationary phase on a minimal medium, and serially diluted samples were spotted on YPAD (upper) or YPAD containing 200 mM LiCl (lower). (D) Protein extracts from the same transformants were analyzed on an anti-Flag immunoblot to visualize Flag-Rim8 and its mutant derivatives.

combination of both Pro536Leu and Lys521Arg substitutions produced a strong loss-of-function phenotype (Fig. 4A, B, and C, lanes 6). Together, these results suggest that partial inactivation of the SXP motif upon replacement of the Pro536 residue with Leu is not sufficient to block Rim signal transduction unless the ubiquitination site is mutated. In light of the fact that the Vps23 UEV domain binds Ub (25), these results are consistent with a contribution of the ubiquitinated residue to the interaction with Vps23 *in vivo*.

To assess the role of Rim8 ubiquitination in Vps23 binding, we used two different approaches. As Rim8 ubiquitination may be a rate-limiting step for the detection of two-hybrid interactions, we first examined whether Ub overexpression restores the two-hybrid binding of Vps23 to Rim8-P536L. Two-hybrid interaction between Vps23 and Rim8-P536L was restored to

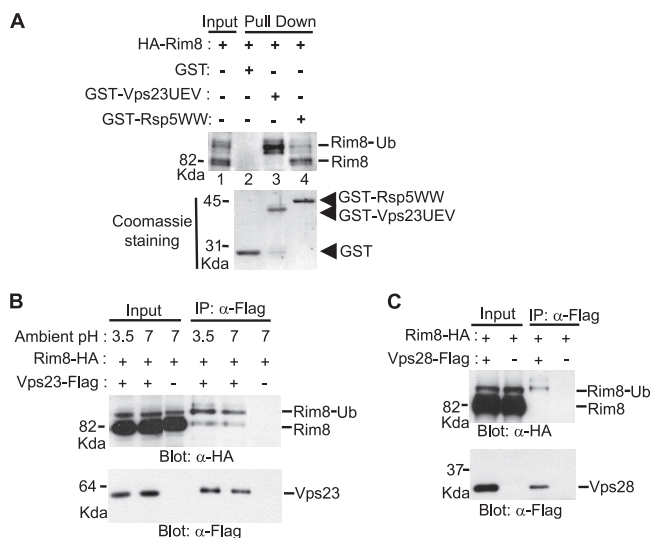


FIG. 5. Interaction of Vps23 and Vps28 with ubiquitinated Rim8. (A) *In vitro* binding of ubiquitinated Rim8 to the Vps23 UEV domain and Rsp5 WW domains. Y04414 (*rim8Δ*) was cotransformed with pHA-Rim8 and Yep96 and grown in the presence of 100 μ M CuSO₄ to overexpress Ub from the *CUP1* promoter in Yep96. Yeast protein extracts were incubated with glutathione-Sepharose beads loaded with GST-Rsp5WW, GST-Vps23UEV, or GST. Pulled down proteins were separated on 10% SDS-PAGE gel and detected by immunoblot analysis with anti-HA Ab (upper) and Coomassie staining (lower). "Input" represents protein extract used for binding experiments (2% of the total reaction mixture). (B) Coimmunoprecipitation of Rim8 and Vps23 from yeast cell extracts. Y04414 (*rim8Δ*) was cotransformed with pRim8-HA and pVps23-Flag (+) or vector control pRS316 (-). Anti-Flag-immunoprecipitated protein extracts (400 μ g) prepared before and after a shift from pH 3.5 to pH 7 were immunoblotted with anti-HA (90% of the total precipitates; upper panel) or anti-Flag (10% of the total precipitates; lower panel) Ab. "Input" represents protein extracts used for immunoprecipitation (12 μ g). (C) Coimmunoprecipitation of Rim8 and Vps28 from yeast cell extracts. Y04414 (*rim8Δ*) and OY121 (*rim8Δ* Vps28-Flag) were transformed with pRim8-HA(U) and grown to mid-log phase (final pH value, 3.5). Anti-Flag-immunoprecipitated protein extracts were analyzed as described above.

about 5% of the wild-type levels upon Ub overexpression, and this effect depends on the integrity of the ubiquitinated K521 residue since no two-hybrid interaction was detected between Rim8-K521R-P536L and Vps23 (Fig. 1D). In contrast to Rim8-P536L, Rim8-ESDP(533-536)/AAAA did not interact with Vps23 when Ub was overexpressed (Fig. 1D), further supporting the idea that the Pro536Leu substitution does not fully inactivate the SXP motif. We then carried out pulldown assays with purified, bacterially expressed GST-Vps23UEV as bait and Rim8 from yeast protein extracts. Ub was overexpressed to improve the detection of ubiquitinated Rim8. In agreement with a role for ubiquitin in Vps23-Rim8 interaction, the Vps23 UEV domain preferentially bound the ubiquitinated form of Rim8 (Fig. 5A, lane 3), although binding to nonubiquitinated Rim8 was also detected under less stringent conditions (data not shown). In contrast, Rim8 ubiquitination did not improve its interaction with Rsp5 WW domains (Fig. 5A, lane 4). Together, these findings indicate that Rim8 ubiquitination contributes to Vps23 binding.

Previous work showed that the translational fusion of the

mammalian Vps23 homolog, Tsg101, to the HIV-1 Gag protein bypasses the requirement for a functional Tsg101-binding Gag PTAP motif in retrovirus budding (34). Then, we tested whether the fusion of Vps23 to C-terminally truncated Rim8 (codons 1 to 504), which lacks both the SXP motif and the ubiquitination site, bypasses the requirement for the C terminus of Rim8 in Rim signaling. Chimeric fusion of Vps23 to Rim8(1-504) fully restored Rim8 function (Fig. 4A, B, and C, compare lanes 2 and 7) and pH-dependent regulation of Rim101 processing (data not shown). The same result was obtained by fusing a truncated form of Vps23, which lacks the UEV domain (data not shown). Thus, the essential role of the Rim8 C terminus, as the HIV-1 Gag PTAP motif, is to recruit the Vps23/Tsg101 UEV domain.

Rim8 associates with ESCRT-I subunits Vps23 and Vps28 in an ambient pH-independent manner. To confirm the interaction of Vps23 and Rim8 *in vivo*, we tested whether these proteins coimmunoprecipitate from cell extracts. A *rim8Δ* strain was cotransformed with plasmids expressing functional Rim8-HA and Vps23-Flag from their own promoter on a centromeric vector, and protein extracts were prepared before and after a shift from pH 3.5 to pH 7 to activate the Rim pathway. Anti-HA immunoblot analysis of Flag-tagged Vps23 immunoprecipitates shows that a fraction of Rim8 coimmunoprecipitated with Flag-Vps23 in an ambient pH-independent manner (Fig. 5B). In agreement with *in vitro* binding assays, Vps23 is preferentially associated with ubiquitinated Rim8 although a small fraction of the nonubiquitinated protein is detected in the precipitates. In control experiments, no Rim8-HA was precipitated by anti-Flag in the absence of Vps23-Flag (Fig. 5B). These results further support the role of Rim8 ubiquitination in Vps23 binding and show that the Rim8-Vps23 interaction is independent of the pH signal. In agreement with these findings, coimmunoprecipitation of Rim8 and Vps23 was also observed in the absence of the putative 7TM pH sensor Rim21 (data not shown). A previous work showed that other components of the ESCRT-I complex are required for Rim signaling (62). We then tested the association of Rim8 with the ESCRT-I subunit Vps28. A *rim8Δ* strain expressing chromosomal Vps28-Flag was transformed with a centromeric plasmid expressing Rim8-HA. Anti-HA immunoblot analysis of Flag-tagged Vps28 immunoprecipitates shows that ubiquitinated Rim8 coimmunoprecipitated with Flag-Vps28 (Fig. 5C). Thus, Rim8 coimmunoprecipitates with both Vps23 and Vps28, strongly suggesting that binding of Rim8 to Vps23 mediates the association of Rim8 with the ESCRT-I complex.

Rim8 ubiquitination is independent of the activation of the Rim pathway but dependent on binding of Vps23 UEV to the SXP motif. Ubiquitination of PalF, the Rim8 homolog in *A. nidulans*, is fully dependent on the pH signal and the 7TM protein PalH, partially dependent on the 3TM protein PalI, and independent of the other specific components of the ambient pH signaling pathway (22). In contrast, and consistent with its lack of regulation by ambient pH, Rim8 ubiquitination does not require any specific component of the Rim pathway, including Rim21 and Dfg16, the two yeast homologs of the putative 7TM pH sensor PalH (Fig. 6A, lanes 1 to 7). In addition, Rim8 ubiquitination was also detected in a strain carrying deletions of both *RIM21* and *DFG16* (data not

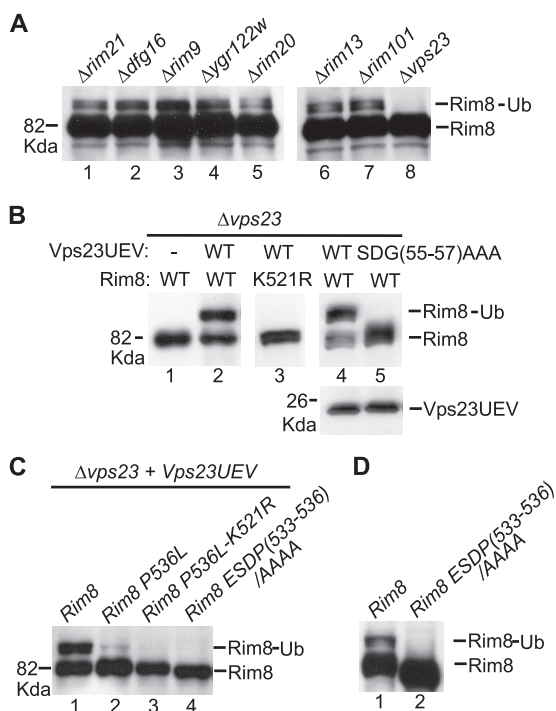


FIG. 6. Rim8 monoubiquitination is dependent on the binding of the Vps23 UEV domain to both Ub and the SXP motif. (A) The indicated mutant strains were transformed with pHA-Rim8, and protein extracts made by alkaline lysis were immunoblotted with anti-HA Ab. (B) Y03416 (*vps23* Δ) was cotransformed with pADH1-HA-Vps23UEV (WT), the indicated mutant derivative [SDG(55-57)AAA] or vector control pWS93 (–), and pHA-Rim8 (WT) or the K521R mutant derivative. Protein extracts made by alkaline lysis were immunoblotted with anti-HA Ab to detect HA-Rim8 (upper) and Vps23UEV-HA (lower, shown only in lanes 4 and 5). (C) Y03416 (*vps23* Δ) was cotransformed with pADH1-HA-Vps23UEV and pHA-Rim8 or the indicated mutant derivatives. Protein extracts made by alkaline lysis were immunoblotted with anti-HA Ab to detect HA-Rim8. (D) Y04414 (*rim8* Δ) was transformed with plasmid pHA-Rim8 or the ESDP(533-536)/AAAA mutant derivative, and protein extracts made by alkaline lysis were immunoblotted with anti-HA Ab.

shown). Unexpectedly, we found that Rim8 ubiquitination is undetectable in a *vps23* Δ mutant strain (Fig. 6A, lane 8). Thus, ubiquitination of Rim8 is independent of the activation of the Rim pathway but strongly dependent on the presence of its binding partner, Vps23. Overexpression of the Vps23 UEV domain is sufficient to restore Rim8 K521 ubiquitination in a *vps23* Δ mutant (Fig. 6B, lanes 2 and 3), although it does not restore Rim signaling (data not shown). Strikingly, the level of monoubiquitinated Rim8 increases up to 50% of the total protein, suggesting that binding of Vps23 UEV to Rim8 promotes the ubiquitination of Rim8. As the UEV domain binds both Ub and the SXP motif, we examined the contribution of each interaction to Rim8 ubiquitination under these conditions. We first generated a Vps23 UEV mutant derivative defective in Ub binding but still able to interact with the Rim8 SXP motif. Structural analysis of the Vps23 UEV domain in a complex with Ub showed that a patch of residues (codons 52 to 57) is specifically involved in Ub recognition (54). In agreement with the structural data, substitution of the last three

residues of this patch to Ala [SDG(55-57)AAA] abolished the Ub-mediated two-hybrid interaction of Vps23 with Rim8 (Fig. 1D) without affecting binding of Vps23 to the Rim8 SXP motif (Fig. 1A). Overexpression of the SDG(55-57)AAA mutant derivative of Vps23 UEV did not restore Rim8 ubiquitination in a *vps23* Δ strain (Fig. 6B, lane 5), thus indicating that Rim8 ubiquitination is strictly dependent on the ability of the UEV domain to bind Ub. Binding of Vps23 UEV to the SXP motif was also required for Rim8 ubiquitination since ubiquitinated Rim8 was undetectable upon inactivation of the SXP motif in Rim8-ESDP(533-536)/AAAA, either in the presence or in the absence of Vps23 UEV overexpression (Fig. 6C, lane 4, and D). In contrast, residual Vps23 UEV-induced ubiquitination of the K521 residue in Rim8-P536L was still detectable (Fig. 6C, compare lanes 2 and 3), which is consistent with the residual Vps23-binding activity of the SXP motif in this mutant. Altogether, these findings indicate that binding of Vps23 UEV to Rim8 promotes its ubiquitination through a mechanism that involves binding of the UEV domain to both Ub and the SXP motif in Rim8.

Overexpressed Rim8 and Vps23 colocalize at cortical punctate structures. Previous studies showed that Vps23 localizes to endosomal compartments and that this localization is lost in the absence of Vps27 (25, 26). As Rim8 appears to substitute Vps27 for recruitment of Vps23, we tested whether overexpression of Rim8 redirects Vps23 to another compartment. Therefore, we examined the localization of RFP-tagged Vps23 either expressed alone or expressed in the presence of GFP-tagged Rim8. Each fusion protein was expressed from its endogenous promoter on a 2 μ m high-copy-number plasmid. As shown previously (25), and consistent with its endosomal distribution, Vps23-RFP localizes to the cytoplasm and internal punctate structures in the absence of Rim8-GFP (Fig. 7). Cooverexpression with Rim8-GFP, however, resulted in recruitment of Vps23-RFP to cortical punctate structures, where it colocalized with Rim8-GFP (Fig. 7). Notably, some internal Vps23-RFP foci that do not coincide with Rim8-GFP foci were still visible under these conditions (Fig. 7, white arrowhead). Relocalization of Vps23-RFP was not observed when Vps23 was cooverexpressed with the Rim8-ESDP(533-536)/AAAA mutant protein, which fails to bind to Vps23 (Fig. 7). Under these conditions, as well as in the absence of overexpressed Vps23-RFP, Rim8-GFP localization was diffuse throughout the cytoplasm, with some nuclear enrichment. Together, these results indicate that colocalization of Rim8 and Vps23 in cortical punctate structures is strictly dependent on the interaction between these two proteins.

DISCUSSION

Previous genetic studies suggested that a Rim pathway-specific protein substitutes Vps27 for specialized recruitment of the ESCRT machinery. Here, we present evidence that the arrestin-related protein Rim8 mediates the recruitment of the ESCRT-I complex to the 7TM protein Rim21. Rim8 interacts with the C-terminal cytoplasmic tail of Rim21 and, as Vps27, binds directly to the Vps23 subunit of ESCRT-I. Bindings of Vps23 to Vps27 and Rim8 share common features, as they involve the Vps23 UEV domain and related P(S/T)XP and SXP motifs in Vps27 and Rim8,

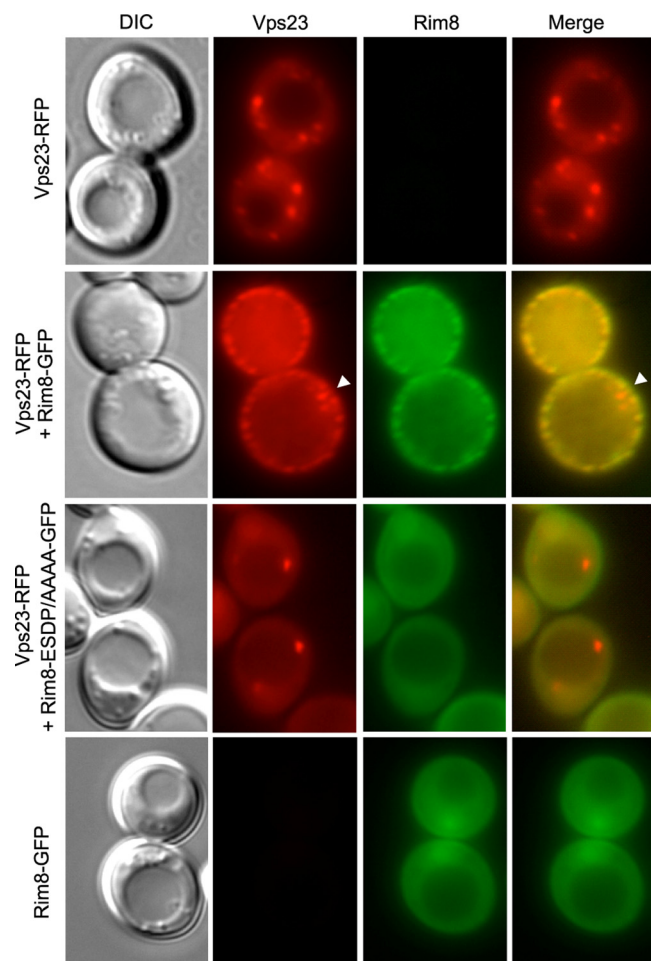


FIG. 7. Overexpressed Rim8 and Vps23 colocalize at the plasma membrane. W303 (WT) was cotransformed with pVps23-RFP or empty vector pRS424 and either pRim8-GFP, the ESDP(533-536)/AAAA mutant derivative, or empty vector pRS423, as indicated on the left of the figure. Cells were grown to mid-log phase on synthetic medium, and the subcellular localization of Vps23-RFP and Rim8-GFP was examined by fluorescence and differential interference contrast (DIC) microscopy. The white arrowhead points to internal Vps23-RFP foci that do not coincide with Rim8-GFP foci.

respectively. These findings support a model in which the specific recruitment of the ESCRT machinery to the 7TM protein Rim21 is mediated by Rim8 arrestin domains whereas recruitment to a large number of ubiquitinated cargos for MVB sorting is mediated by Vps27 UIM domains. In agreement with this model, staining with the dye FM4-64 indicates that the *rim8* Δ mutant does not have an MVB defect (data not shown), which is consistent with previous work showing that Rim signaling components such as Dfg16, Rim21, and Rim101 are not required for MVB pathway function (62).

Both Rim8 and mammalian β -arrestins serve as adaptors linking 7TM proteins to the endocytic machinery. However, whereas β -arrestins bind to clathrin and the clathrin adaptor AP-2, Rim8 interacts with Vps23, a component of the ESCRT machinery. The Vps23-binding site is located at the C terminus of Rim8 in a position similar to that of clathrin and AP-2 binding sites in β -arrestins. Interaction of clathrin with β -ar-

restin-2 is regulated as accessibility of the clathrin binding site increases upon binding of arrestin to the activated 7TM receptor (60). In contrast, the Rim8-Vps23 interaction does not appear to be regulated by the pH signal in coimmunoprecipitation assays. In addition, pH sensing does not require the dissociation of Vps23 from Rim8, as shown by the ability of the Rim8(1-504)-Vps23 chimera to trigger the pH response. These findings support a model in which, in the absence of pH signal transduction, Rim8 is bound to Vps23. Coimmunoprecipitation of Rim8 with both Vps23 and Vps28 suggests that binding of Rim8 to Vps23 mediates the association of Rim8 with ESCRT-I. We hypothesize that, by analogy with the regulation of the receptor-arrestin complex in mammals, binding of Rim8 to the 7TM protein Rim21 mediates the recruitment of the Rim8-bound ESCRT-I complex in response to the pH signal. Vps23 appears to exist exclusively as a component of ESCRT-I (25), and our results indicate that a small fraction of Rim8, which is ubiquitinated, associates with Vps23 and Vps28 in coimmunoprecipitation assays. Ubiquitinated Rim8 is present in a much smaller amount than Vps23 in the cell, suggesting that Rim8 associates with a very small fraction of ESCRT-I. This finding could explain why Rim8 has not been identified as an ESCRT-I associated protein in previous studies.

According to the current model of the Rim pathway, Rim8-mediated endocytic internalization of Rim21 and/or Dfg16 would make the connection between the plasma membrane pH-sensing complex and the endosomal ESCRT-associated Rim101-processing machinery. Our findings that Rim8 binds to both Rim21 and Vps23 would provide the missing link between these two complexes. The hypothetical existence of two spatially segregated complexes in the Rim pathway was proposed on the basis that Rim20 colocalizes with the endosomal marker Snf7-RFP (8). However, it has been shown that C-terminal GFP fusion of Snf7 produces a class E mutant phenotype and accumulates on endosomes (53). Additionally, class E mutations that block ESCRT-III disassembly have been found to bypass the ambient-pH regulatory system, permitting Rim101 processing in the absence of pH-sensing components (20). Thus, we cannot exclude the possibility that location of Rim20 upon Snf7-RFP expression does not represent the Rim20 population that mediates the pH signal under physiological conditions. Then, alternative models, which do not involve spatially segregated complexes, can also be considered. Rim8 appears to associate with ESCRT-I in an ambient pH-independent manner, which is consistent with the idea that binding of Rim8 to the putative ambient pH sensor Rim21 could also mediate recruitment of ESCRTs to the plasma membrane. Such localization of ESCRTs would not be without precedent, since these protein complexes are involved in retroviral budding at the plasma membrane in mammalian cells (36). Additionally, previous studies of *A. nidulans* showed that components of the pH-sensing complex localize to the plasma membrane (9) and that the pH signaling component PalC, which binds ESCRT-III subunit Snf7, is recruited to the plasma membrane in an ambient pH-dependent manner (15). Interestingly, we found that overexpressed Rim8 and Vps23 colocalize at cortical punctate structures. These structures are not observed when the two proteins fail to interact or when either protein is overexpressed alone. This result, which provides additional evidence of the Rim8-Vps23 interaction, is

consistent with the localization of Rim8-GFP expressed from the *RIM8* genomic locus to peripheral puncta (33). However, these data should be considered with caution since Rim8 overexpression may cause mislocalization of Vps23 to the plasma membrane. Additionally, the fluorescence signal is not representative of ESCRT-I, since Vps23 is overexpressed and the other ESCRT-I subunits are not present stoichiometrically. Thus, further studies will be necessary to determine the location of Rim8-mediated recruitment of the ESCRT machinery.

Our results indicate that the SXP motif in Rim8 is the primary determinant of the interaction with Vps23. Inactivation of the SXP motif in the Rim8-ESDP(533-536)/AAAA mutant abolished Vps23 binding and Rim signaling. In contrast, we found that replacement of the Pro536 residue with Leu does not fully inactivate the SXP motif. Although interaction of Vps23 with Rim8-P536L was not detectable in two-hybrid assays, the residual binding detected between these two proteins in pulldown experiments appears to be sufficient to support Rim8 function *in vivo*. Several lines of evidence support the idea that the SXP motif in Rim8 is related to the previously described P(S/T)XP motif which binds both Vps23 and its mammalian homolog Tsg101 (2, 6, 16, 26). First, both SXP and P(S/T)XP motifs bind to the Vps23/Tsg101 UEV domain. Second, the SXP motif in Rim8 box 1 corresponds to a PSXP motif in the related box 2 sequence found in Rim8 homologs in other fungi. These proteins contain either box 1, box 2, or both, suggesting that SXP and PSXP motifs play the same function. Third, the last Pro residue in the HIV-1 Gag PTAP motif and in the Rim8 SXP motif plays an important role, as its replacement with a Leu residue markedly reduced *in vitro* binding to Tsg101 and Vps23, respectively. In contrast, the replacement of the first Pro residue of the Gag PTAP motif with Ala only moderately reduced Tsg101 binding (16), which is consistent with the ability of its yeast homolog Vps23 to bind both an SDP motif in Rim8 and PSDP motifs in Vps27. It is noteworthy that a recent study showed that the first Pro residue in the feline immunodeficiency virus (FIV) Gag PSAP motif is not required for its function in retrovirus budding (10).

We present genetic and biochemical evidence that a monoubiquitinated Lys residue located 12 residues upstream of the SXP motif contributes to Vps23 binding *in vivo*. Ub overexpression partially restores the two-hybrid interaction between Vps23 and the Rim8-P536L mutant protein, and this effect is dependent on the integrity of the ubiquitinated residue. In addition, pulldown and coimmunoprecipitation assays indicate that Vps23 preferentially binds to the ubiquitinated form of Rim8. In agreement with these results, partial inactivation of the SXP motif upon replacement of the Pro536 residue with Leu is not sufficient to block Rim signal transduction unless the ubiquitination site is mutated. The contribution of these two elements to Vps23 UEV binding is consistent with evidence that the UEV domain of Tsg101 can bind both Ub and the related PTAP motif simultaneously (52). Structural studies indicate that the P(S/T)XP and Ub binding sites in Tsg101 and Vps23 UEV could create a continuous binding surface upon monoubiquitination of a Lys residue upstream of the P(S/T)XP motif (42, 54). This model is supported by our findings and is consistent with the position of the monoubiquitinated residue in Rim8 and with the high level of conservation of the

distance (12 residues) between this residue and the SXP motif in Rim8 homologs.

We further show that Rim8 ubiquitination is dependent on Rsp5, an E3 Ub ligase of the Nedd4 family. Ubiquitinated Rim8 is undetectable in an *npi* mutant, which has very low levels of Rsp5. In addition, a PXY motif located 12 residues upstream of the ubiquitinated residue in Rim8 mediates a direct interaction with Rsp5 WW domains and is required for Rim8 ubiquitination. This result is contrary to previously published data showing that Rim8 from yeast cell extracts, in contrast to other yeast arrestin-related proteins, does not bind Rsp5 WW domains *in vitro* (33). We found that Rim8 is ubiquitinated in a pH-independent manner, suggesting that the interaction with Rsp5 is not regulated by the pH signal. The extraction procedure used in this earlier study may not disrupt the association of Rim8 with endogenous Rsp5, which would prevent the binding of GST-WW to the PXY motif. Thus, our data provide further support to the role of yeast arrestin-related proteins as ubiquitin ligase adaptors (33, 37). Furthermore, our results indicate that the Rsp5-dependent monoubiquitination of Rim8 contributes to the recruitment of the ESCRT machinery. This function of Rim8 may be shared by other yeast arrestin-related proteins (ARTs) that regulate the internalization by endocytosis of specific plasma membrane proteins (33, 37). As mammalian β -arrestin-1 appears to play additional roles in later postinternalization events (5), it is possible that other yeast ARTs mediate the recruitment of the ESCRT machinery for sorting in the MVB pathway.

Our results indicate that binding of Vps23 UEV to Rim8 promotes the ubiquitination of Rim8. Rim8 ubiquitination is undetectable in a *vps23 Δ* mutant and is restored and even strongly increased upon overexpression of Vps23 UEV. In addition, this effect is dependent on the interaction of the UEV domain with both Ub and the SXP motif. A possible explanation for this unexpected result is that binding of Vps23 to Rim8 occurs in two steps. First, Vps23 would bind to the SXP motif in Rim8 and to Ub linked to the active site of the E3 Ub ligase Rsp5. These two interactions could be required for the correct positioning of Ub and its subsequent linkage to the Rim8 K521 residue. Rim8 ubiquitination would then stabilize the interaction of Rim8 with Vps23. Residual ubiquitination of Rim8-P536L would explain why this mutant protein remains functional unless the K521 residue is mutated. The hypothesis that binding of Ub to Vps23 UEV precedes the linkage of Ub to Rim8 is supported by previous work showing that the Mms2 UEV domain is required for the correct positioning of Ub for linkage-specific polyubiquitin chain formation (13). Although Rim8 ubiquitination appears to contribute to the interaction with Vps23 UEV, it does not play an essential role in Rim signaling. Inactivation of the ubiquitination site does not impair Rim signaling, and we observed only a slight defect in the kinetics of Rim101 processing in response to the pH signal (data not shown). Thus, further studies will be necessary to determine whether Rim8 ubiquitination plays a specific role in the fine-tuning of the Rim pathway.

Strikingly, our findings indicate that the same or related motifs mediate the recruitment of the ESCRT machinery to Pal/Rim proteins in fungi and retroviral Gag proteins in animal cells (Fig. 8). Recruitment of Tsg101, AIP1/Alix, and members of the Nedd4 family of Ub ligases to viral proteins is mediated

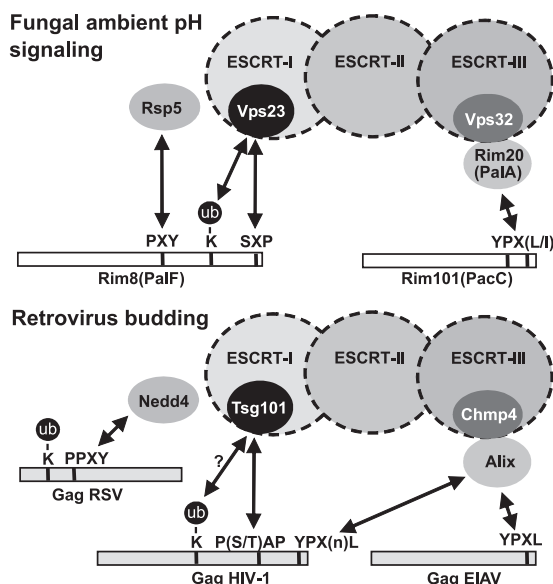


FIG. 8. Conserved interactions of the ESCRT machinery with components of the Pal/Rim signaling pathway and retroviral Gag proteins. A schematic representation (not to scale) of the two components of the Pal/Rim pathway in *S. cerevisiae*, Rim8 and Rim101 (PalF and PacC in *A. nidulans*), and the retroviral Gag proteins of Rous sarcoma virus (RSV), HIV-1, and equine infectious anemia virus (EIAV) shows the positions of the PXY, SXP, and YPX(L/I) motifs in the yeast proteins and the related PPXY, P(S/T)AP, and YPXL motifs in retroviral Gag proteins. Protein monoubiquitination is indicated. The conservation of the ESCRT machinery and associated proteins in fungi and vertebrates is highlighted. Double arrows indicate protein-protein interactions.

by P(S/T)AP, YPXL, and PPXY motifs, respectively (36). Here, we show that SXP and PXY motifs located at the C terminus of Rim8 interact with the Tsg101 and Nedd4 fungal homologs Vps23 and Rsp5, and we previously found that YPX(L/I) motifs in PacC interact with the AIP1/Alix homolog PalA (58). The analogy between Pal/Rim signaling and retrovirus budding is further supported by other evidence. While the translational fusion of Tsg101 to HIV-1 Gag restores retrovirus budding in the absence of a functional Tsg101-binding PTAP motif in the Gag protein (34), fusion of Vps23 to C-terminally truncated Rim8, which lacks the Vps23-binding site, restores Rim8 function and Rim signaling. In addition, it has been suggested that the PTAP-mediated binding of HIV-1 Gag to Tsg101 is stabilized by Gag monoubiquitination (16). We show here that such a molecular mechanism actually occurs in the Rim signaling pathway, where both a monoubiquitinated residue and an SXP motif contribute to the interaction with Vps23 (Fig. 8). Finally, we found that overexpression of Rim8 redirects Vps23 to the plasma membrane in a manner reminiscent of the HIV-1 Gag-dependent relocation of Tsg101 to the plasma membrane of mammalian cells (39). Thus, on the basis of these new findings and our previous identification of the YPXL motif as an AIP1/Alix binding site (58), we believe that the analysis of the Pal/Rim signaling pathway in fungi will provide new clues to the molecular mechanisms involved in retrovirus budding.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jacqueline Segall, Mark Hochstrasser, Linda Hicke, and Francisco Portillo for plasmids and strains.

This work was supported by grants from the Spanish CICYT (BFU2005-01970 and BFU2008-02005), the Comunidad de Madrid and CSIC (CCG07-CSIC/SAL-2145), and Intramural-CSIC (2006 201094). A.H. is recipient of a CSIC-JAE predoctoral fellowship, and S.H. held a Plan de Formación de Personal Investigador studentship.

REFERENCES

- Babst, M., D. J. Katmann, E. J. Estepa-Sabal, T. Meerloo, and S. D. Emr. 2002. Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev. Cell* 3:271–282.
- Bache, K. G., A. Brech, A. Mehlum, and H. Stenmark. 2003. Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J. Cell Biol.* 162:435–442.
- Bartel, P. L., C. Chien, R. Sternglanz, and S. Fields. 1993. Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions, p. 153–179. In D. A. Hartley (ed.), *Cellular interactions in development: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
- Barwell, K. J., J. H. Boysen, W. Xu, and A. P. Mitchell. 2005. Relationship of DFG16 to the Rim101p pH response pathway in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* 4:890–899.
- Bhandari, D., J. Trejo, J. L. Benovic, and A. Marchese. 2007. Arrestin-2 interacts with the ubiquitin-protein isopeptide ligase atrophin-interacting protein 4 and mediates endosomal sorting of the chemokine receptor CXCR4. *J. Biol. Chem.* 282:36971–36979.
- Bilodeau, P. S., S. C. Winistorfer, W. R. Kearney, A. D. Robertson, and R. C. Piper. 2003. Vps27-Hsc1 and ESCRT-I complexes cooperate to increase efficiency of sorting ubiquitinated proteins at the endosome. *J. Cell Biol.* 163:237–243.
- Blanchin-Roland, S., G. Da Costa, and C. Gaillardin. 2005. ESCRT-I components of the endocytic machinery are required for Rim101-dependent ambient pH regulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology* 151: 3627–3637.
- Boysen, J. H., and A. P. Mitchell. 2006. Control of Bro1-domain protein Rim20 localization by external pH, ESCRT machinery, and the *Saccharomyces cerevisiae* Rim101 pathway. *Mol. Biol. Cell* 17:1344–1353.
- Calcagno-Pizarelli, A. M., S. Negrete-Urtasun, S. H. Denison, J. D. Rudnicka, H. J. Bussink, T. Munera-Huertas, L. Stanton, A. Hervas-Aguilar, E. A. Espeso, J. Tilburn, H. N. Arst, Jr., and M. A. Peñalva. 2007. Establishment of the ambient pH signaling complex in *Aspergillus nidulans*: PalF assists plasma membrane localization of PalH. *Eukaryot. Cell* 6:2365–2375.
- Calistri, A., C. Del Vecchio, C. Salata, M. Celestino, M. Celegato, H. Göttlinger, G. Palù, and C. Parolin. 2009. Role of the feline immunodeficiency virus L-domain in the presence or absence of Gag processing: involvement of ubiquitin and Nedd4-2s ligase in viral egress. *J. Cell. Physiol.* 218:175–182.
- Chang, A., S. Cheang, X. Espanel, and M. Sudol. 2000. Rsp5 WW domains interact directly with the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 275:20562–20571.
- Cornet, M., F. Bidard, P. Schwarz, G. Da Costa, S. Blanchin-Roland, F. Dromer, and C. Gaillardin. 2005. Deletions of endocytic components VPS28 and VPS32 affect growth at alkaline pH and virulence through both RIM101-dependent and RIM101-independent pathways in *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 73:7977–7987.
- Eddins, M. J., C. M. Carlile, K. M. Gomez, C. M. Pickart, and C. Wolberger. 2006. Mms2-Ubc13 covalently bound to ubiquitin reveals the structural basis of linkage-specific polyubiquitin chain formation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13:915–920.
- Funakoshi, M., and M. Hochstrasser. 2009. Small epitope-linker modules for PCR-based C-terminal tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 26: 185–192.
- Galindo, A., A. Hervas-Aguilar, O. Rodriguez-Galan, O. Vincent, H. N. Arst, Jr., J. Tilburn, and M. A. Peñalva. 2007. PalC, one of two Bro1 domain proteins in the fungal pH signalling pathway, localizes to cortical structures and binds Vps32. *Traffic* 8:1346–1364.
- Garrus, J. E., U. K. von Schwedler, O. W. Pornillos, S. G. Morham, K. H. Zavitz, H. E. Wang, D. A. Wettstein, K. M. Stray, M. Cote, R. L. Rich, D. G. Myszka, and W. I. Sundquist. 2001. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 107:55–65.
- Goodman, O. B., Jr., J. G. Krupnick, F. Santini, V. V. Gurevich, R. B. Penn, A. W. Gagnon, J. H. Keen, and J. L. Benovic. 1996. Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* 383:447–450.
- Guarente, L. 1983. Yeast promoters and lacZ fusions designed to study expression of cloned genes in yeast. *Methods Enzymol.* 101:181–191.
- Gupta, R., B. Kus, C. Fladd, J. Wasmuth, R. Tonikian, S. Sidhu, N. J. Krogan, J. Parkinson, and D. Rotin. 2007. Ubiquitination screen using protein microarrays for comprehensive identification of Rsp5 substrates in yeast. *Mol. Syst. Biol.* 3:116.

20. Hayashi, M., T. Fukuzawa, H. Sorimachi, and T. Maeda. 2005. Constitutive activation of the pH-responsive Rim101 pathway in yeast mutants defective in late steps of the MVB/ESCRT pathway. *Mol. Cell. Biol.* **25**:9478–9490.
21. Hein, C., J. Y. Springael, C. Volland, R. Hagenauer-Tsapis, and B. Andre. 1995. NPI1, an essential yeast gene involved in induced degradation of Gap1 and Fur4 permeases, encodes the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Mol. Microbiol.* **18**:77–87.
22. Herranz, S., J. M. Rodriguez, H. J. Bussink, J. C. Sanchez-Ferrero, H. N. Arst, Jr., M. A. Peñalva, and O. Vincent. 2005. Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**:12141–12146.
23. Hochstrasser, M., M. J. Ellison, V. Chau, and A. Varshavsky. 1991. The short-lived MAT alpha 2 transcriptional regulator is ubiquitinated *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**:4606–4610.
24. Hurley, J. H. 2008. ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**:4–11.
25. Katzmann, D. J., M. Babst, and S. D. Emr. 2001. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* **106**:145–155.
26. Katzmann, D. J., C. J. Stefan, M. Babst, and S. D. Emr. 2003. Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J. Cell Biol.* **162**:413–423.
27. Kim, J., and J. P. Hirsch. 1998. A nucleolar protein that affects mating efficiency in *Saccharomyces cerevisiae* by altering the morphological response to pheromone. *Genetics* **149**:795–805.
28. Kullas, A. L., M. Li, and D. A. Davis. 2004. Snf7p, a component of the ESCRT-III protein complex, is an upstream member of the RIM101 pathway in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* **3**:1609–1618.
29. Laporte, S. A., R. H. Oakley, J. A. Holt, L. S. Barak, and M. G. Caron. 2000. The interaction of beta-arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of beta 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits. *J. Biol. Chem.* **275**:23120–23126.
30. Laporte, S. A., R. H. Oakley, J. Zhang, J. A. Holt, S. S. Ferguson, M. G. Caron, and L. S. Barak. 1999. The beta 2-adrenergic receptor/beta arrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**:3712–3717.
31. Lefkowitz, R. J., and S. K. Shenoy. 2005. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* **308**:512–517.
32. Li, W. S., and A. P. Mitchell. 1997. Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. *Genetics* **145**:63–73.
33. Lin, C. H., J. A. MacGurn, T. Chu, C. J. Stefan, and S. D. Emr. 2008. Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. *Cell* **135**:714–725.
34. Martin-Serrano, J., T. Zang, and P. D. Bieniasz. 2001. HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat. Med.* **7**:1313–1319.
35. Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.
36. Morita, E., and W. I. Sundquist. 2004. Retrovirus budding. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**:395–425.
37. Nikko, E., J. A. Sullivan, and H. R. Pelham. 2008. Arrestin-like proteins mediate ubiquitination and endocytosis of the yeast metal transporter Smf1. *EMBO Rep.* **9**:1216–1221.
38. Nikko, E., and B. Andre. 2007. Evidence for a direct role of the Doa4 deubiquitinating enzyme in protein sorting into the MVB pathway. *Traffic* **8**:566–581.
39. Nydegger, S., S. Khurana, D. N. Kremensov, M. Foti, and M. Thali. 2006. Mapping of tetraspanin-enriched microdomains that can function as gateways for HIV-1. *J. Cell Biol.* **173**:795–807.
40. Papa, F. R., and M. Hochstrasser. 1993. The yeast DOA4 gene encodes a deubiquitinating enzyme related to a product of the human tre-2 oncogene. *Nature* **366**:313–319.
41. Peñalva, M. A., J. Tilburn, E. Bignell, and H. N. Arst, Jr. 2008. Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends Microbiol.* **16**:291–300.
42. Pornillos, O., S. L. Alam, D. R. Davis, and W. I. Sundquist. 2002. Structure of the Tsg101 UEV domain in complex with the PTAP motif of the HIV-1 p6 protein. *Nat. Struct. Biol.* **9**:812–817.
43. Rodriguez-Galan, O., A. Galindo, A. Hervás-Aguilar, H. N. Arst, Jr., and M. A. Peñalva. 2009. Physiological Involvement in pH signaling of Vps24-mediated recruitment of *Aspergillus* PalB cysteine protease to ESCRT-III. *J. Biol. Chem.* **284**:4404–4412.
44. Rose, M. D., F. Winston, and P. Hieter. 1990. Methods in yeast genetics: a laboratory course manual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.
45. Rothfels, K., J. C. Tanny, E. Molnar, H. Friesen, C. Commisso, and J. Segall. 2005. Components of the ESCRT pathway, DFG16, and YGR122w are required for Rim101 to act as a corepressor with Nrg1 at the negative regulatory element of the DIT1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **25**:6772–6788.
46. Ruden, D. M., J. Ma, Y. Li, K. Wood, and M. Ptashne. 1991. Generating yeast transcriptional activators containing no yeast protein sequences. *Nature* **350**:250–252.
47. Saksena, S., J. Wahlman, D. Teis, A. E. Johnson, and S. D. Emr. 2009. Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell* **136**:97–109.
48. Saksena, S., J. Sun, T. Chu, and S. D. Emr. 2007. ESCRTing proteins in the endocytic pathway. *Trends Biochem. Sci.* **32**:561–573.
49. Sikorski, R. S., and P. Hieter. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**:19–27.
50. Song, W., and M. Carlson. 1998. Srb/mediator proteins interact functionally and physically with transcriptional repressor Sfl1. *EMBO J.* **17**:5757–5765.
51. Springael, J. Y., and B. Andre. 1998. Nitrogen-regulated ubiquitination of the Gap1 permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **9**:1253–1263.
52. Sundquist, W. I., H. L. Schubert, B. N. Kelly, G. C. Hill, J. M. Holton, and C. P. Hil. 2004. Ubiquitin recognition by the human TSG101 protein. *Mol. Cell* **13**:783–789.
53. Teis, D., S. Saksena, and S. D. Emr. 2008. Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Dev. Cell* **15**:578–589.
54. Teo, H., D. B. Veprincev, and R. L. Williams. 2004. Structural insights into endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) recognition of ubiquitinated proteins. *J. Biol. Chem.* **279**:28689–28696.
55. Terrell, J., S. Shih, R. Dunn, and L. Hicke. 1998. A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor. *Mol. Cell* **1**:193–202.
56. Tyers, M., G. Tokiwa, R. Nash, and B. Futcher. 1992. The Cln3-Cdc28 kinase complex of *S. cerevisiae* is regulated by proteolysis and phosphorylation. *EMBO J.* **11**:1773–1784.
57. Vincent, O., and M. Carlson. 1999. Gal83 mediates the interaction of the Snf1 kinase complex with the transcription activator Sip4. *EMBO J.* **18**:6672–6681.
58. Vincent, O., L. Rainbow, J. Tilburn, H. N. Arst, Jr., and M. A. Peñalva. 2003. YPXL/I is a protein interaction motif recognized by aspergillus PalA and its human homologue, AIP1/Alix. *Mol. Cell. Biol.* **23**:1647–1655.
59. Volland, C., D. Urban-Grimal, G. Geraud, and R. Hagenauer-Tsapis. 1994. Endocytosis and degradation of the yeast uracil permease under adverse conditions. *J. Biol. Chem.* **269**:9833–9841.
60. Xiao, K., S. K. Shenoy, K. Nobles, and R. J. Lefkowitz. 2004. Activation dependent conformational changes in beta-arrestin 2. *J. Biol. Chem.* **279**:55744–55753.
61. Xu, W., and A. P. Mitchell. 2001. Yeast PalA/AIP1/Alix homolog Rim20p associates with a PEST-like region and is required for its proteolytic cleavage. *J. Bacteriol.* **183**:6917–6923.
62. Xu, W., F. J. Smith, Jr., R. Subaran, and A. P. Mitchell. 2004. Multivesicular body-ESCRT components function in pH response regulation in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* **15**:5528–5537.

Review Article

Ubiquitin-Mediated Regulation of Endocytosis by Proteins of the Arrestin Family

Michel Becuwe,¹ Antonio Herrador,² Rosine Haguenauer-Tsapis,¹
Olivier Vincent,² and Sébastien Léon¹

¹*Institut Jacques Monod, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7592, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, 75205 Paris, France*

²*Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC-UAM, Arturo Duperier, 4, 28029 Madrid, Spain*

Correspondence should be addressed to Olivier Vincent, ovincent@iib.uam.es
and Sébastien Léon, leon.sebastien@ijm.univ-paris-diderot.fr

Received 1 June 2012; Accepted 28 July 2012

Academic Editor: Dmitry Karpov

Copyright © 2012 Michel Becuwe et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

In metazoans, proteins of the arrestin family are key players of G-protein-coupled receptors (GPCRs) signaling and trafficking. Following stimulation, activated receptors are phosphorylated, thus allowing the binding of arrestins and hence an “arrest” of receptor signaling. Arrestins act by uncoupling receptors from G proteins and contribute to the recruitment of endocytic proteins, such as clathrin, to direct receptor trafficking into the endocytic pathway. Arrestins also serve as adaptor proteins by promoting the recruitment of ubiquitin ligases and participate in the agonist-induced ubiquitylation of receptors, known to have impact on their subcellular localization and stability. Recently, the arrestin family has expanded following the discovery of arrestin-related proteins in other eukaryotes such as yeasts or fungi. Surprisingly, most of these proteins are also involved in the ubiquitylation and endocytosis of plasma membrane proteins, thus suggesting that the role of arrestins as ubiquitin ligase adaptors is at the core of these proteins’ functions. Importantly, arrestins are themselves ubiquitylated, and this modification is crucial for their function. In this paper, we discuss recent data on the intricate connections between arrestins and the ubiquitin pathway in the control of endocytosis.

1. Introduction

The name of “arrestin” was initially given to a 48-kDa protein that was essential to “arrest” the signal following the photoexcitation of rhodopsin, a photoreceptor of the G-protein-coupled receptors (GPCRs) family expressed in rod and cone cells of the retina [1, 2]. A second isoform involved in the same process has later been identified; both of these proteins are now designated visual arrestins (or arrestin-1 and -4) (for review see [3]). A similar regulatory system was described for another GPCR, the β 2-adrenergic receptor (β 2-AR), which involves two other arrestins, named β -arrestin-1 and -2 (or arrestin-2 and -3, resp.) [4–6]. β -arrestins are ubiquitously expressed and were later found to regulate a large number of receptors in addition to β 2-AR.

2. Arrestin-Mediated Regulation of GPCRs

2.1. Arrestin-Dependent Uncoupling of GPCRs from G-Proteins. Arrestins are key players in the regulation of GPCR signaling activity. Upon agonist stimulation, GPCRs undergo conformational changes leading to their association to heterotrimeric G proteins and subsequent activation, thereby triggering appropriate signal transduction pathways. Receptor desensitization is initiated after ligand binding through the phosphorylation of residues within their cytosolic loops by G-protein-coupled receptor kinases (GRKs). This modification allows arrestin docking to the GPCR, which in turn favors the uncoupling between the receptor and the G protein. Indeed, β -arrestins are cytosolic proteins that, in response to receptor stimulation, relocate rapidly to

the plasma membrane [7]. Structural and structure-function studies of visual arrestins identified a phosphate-sensor domain in the polar core of the protein [8]. Intramolecular interactions between the C-terminal tail and the phosphate sensor region maintain the arrestin in an inactive state, and this interaction is disrupted upon binding to the phosphorylated receptor. This interaction is followed by a conformational change of the arrestin molecule and leads to a high-affinity receptor-binding state. Arrestin recruitment onto the phosphorylated receptor hinders its interaction with G protein, and consequently silences the activation of the GPCR-G protein-signaling module.

2.2. Arrestins and GPCR Endocytosis. Another crucial component of GPCR regulation operates at the level of their localization [9]. Endocytosis plays a major role in the modulation of GPCR signaling activity, and, again, this regulation involves β -arrestins [10]. Indeed, β -arrestins act as endocytic adaptor proteins that recruit components of the endocytosis machinery to promote GPCR internalization and/or degradation. β -arrestins interact with clathrin through a clathrin-binding motif [11–13] to promote GPCR association to clathrin-coated pits (CCPs). Deletion of the clathrin-binding site abrogates arrestin-promoted trafficking of the β 2-AR [14]. Additionally, β -arrestins interact with the clathrin adaptor complex AP-2 upon GPCR binding [14–16], to promote clathrin-coat assembly and receptor targeting to CCPs [17]. In addition to clathrin, β -arrestins also bind to other components of the endocytic machinery such as the N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF), the small G protein ARF6, and the phosphatidylinositol 4-phosphate 5 kinase PIP5 K I α [18–20].

2.3. Arrestins as Signaling Scaffolds. Besides their functions in GPCR desensitization and trafficking, β -arrestins are also capable of generating their own signals by scaffolding signaling molecules, such as non-receptor tyrosine kinases of the Src family, or MAP (mitogen-activated protein) kinases (ERK1/2, c-Jun N-terminal kinase 3 JNK3) (reviewed in [21]). β -arrestins therefore mediate a second wave of signaling distinct from G-protein-dependent signaling.

2.4. Arrestins and Ubiquitin. β -arrestins were also shown to regulate the final fate of the receptor, by acting on the balance between receptor recycling to the plasma membrane, or its lysosomal degradation. The posttranslational modification of plasma membrane proteins, including receptors, by ubiquitin is known to affect their sorting along the endocytic pathway [22, 23]. β -arrestins have the ability to recruit ubiquitin ligases and promote receptor ubiquitylation, therefore acting as “adaptor” proteins [24]. Interestingly, a phylogenetic study has revealed that proteins of the arrestin family are present in all eukaryotes, except plants [25, 26]. A body of evidence (detailed later in this review, [27]) indicates that these arrestin-related proteins are also involved in the regulation of plasma membrane proteins trafficking by acting as ubiquitin ligase adaptors. Therefore,

this function seems to be one of the most conserved features within the arrestin family [28, 29].

Both arrestins and arrestin-related proteins are themselves targets of ubiquitylation. This was discovered very early on for β -Arr2 in response to agonist stimulation [30]. Likewise, the fungal arrestin-related protein PalF was shown to be ubiquitylated in response to alkaline ambient pH, in a signal- and receptor- (PalH) dependent manner [31]. This ubiquitylation appeared crucial for the proper function of arrestins [24, 32–35], but the precise role of this modification is poorly understood. An additional layer of complexity has recently been added following the observations that β -arrestins interact with deubiquitylating enzymes that regulate their ubiquitylation status as well as receptor ubiquitylation and, consequently, their fate [35–37].

In this review, we will focus on the connections between arrestins and ubiquitin. We will detail the function of arrestins and arrestin-related proteins as ubiquitin ligase adaptor and discuss how arrestin functions could be regulated by ubiquitylation.

3. Arrestins as Ubiquitin Ligase Adaptors

3.1. Ubiquitin and Endocytic Protein Sorting. Studies in the last decades have shown that ubiquitin is a master regulator of endocytosis in eukaryotes. Early work performed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* demonstrated that ubiquitin is involved in the endocytosis of plasma membrane proteins, such as ABC (ATP-binding cassette) transporters [38], receptor [39, 40], or permeases [41]. The ubiquitylation of plasma membrane proteins appears to trigger their internalization and targeting to endosomes [42], although the existence of an ubiquitin-independent internalization mechanism is also documented [43]. In mammalian cells, the situation is more complex, as several internalization pathways exist in the cell with only some of them regulated by ubiquitin [44].

Initially, it has been proposed that ubiquitylated cargoes are recognized in yeast and mammals by the ubiquitin-binding motifs of various proteins involved in endocytosis, such as Eps15 (Ede1 in yeast) and Epsin (Eps15 interacting; Ent1 and Ent2 in yeast) which display UIM (ubiquitin-interacting motif) or UBA (ubiquitin-associated) domains [45, 46]. In addition, these endocytic proteins can also interact with phosphoinositides and clathrin, making them ideal candidates to coordinate ubiquitin recognition and cargo internalization. While such a function appears to be established in mammalian cells [47–49], recent data in yeast favor a more complex model, where ubiquitin-binding domains would play a more general role in protein interactions and the assembly of the endocytic network [50]. Noteworthy, in mammalian cells, endocytic adaptors are often ubiquitylated in response to extracellular stimuli, and this contributes greatly to the ubiquitin-based signaling triggered upon cell stimulation [23, 51–53].

A second major ubiquitin-dependent step in the endocytic pathway occurs at multivesicular bodies (MVBs) and is required for cargo delivery into lysosomes [54]. Cargo

ubiquitylation provides the crucial signal for entering into this pathway. A series of protein complexes, collectively named ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) carry ubiquitin-binding domains and act in concert to allow the recognition and sorting of ubiquitylated cargoes into luminal vesicles of MVBs [55]. Therefore, lack of cargo ubiquitylation at this stage leads to a defective targeting to the lysosome, and, eventually, recycling [56].

In mammalian cells, initial studies showed that the ubiquitin conjugation system is important for the downregulation of the growth hormone receptor (GHR) [57]. Also, the study of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel ENaC clearly established that its ubiquitylation regulates the channel's stability [58]. Subsequent work on ENaC, GHR, and many other receptors (such as EGFR, PDGFR, c-Met, TGF- β R, β 2-AR) confirmed the critical function of ubiquitin in endocytosis in mammals [23, 59, 60]. However, where this ubiquitylation occurs in the cell (plasma membrane or endosomal compartments), and how ubiquitylation impacts on the target receptor's fate (internalization, progression through the endocytic pathway, or degradation) are still a matter of debate and seem to vary upon the receptor and the physiological situation considered [61]. Also, it should be noted that while ubiquitin-mediated endocytosis appears as the main pathway in yeast, ubiquitin-independent endocytosis is more represented in higher eukaryotes [44, 62].

3.2. The "Classic" β -Arr2/ β 2-AR Couple. A first evidence for the role of arrestins in receptor ubiquitylation came from a study by Shenoy and colleagues who observed that the β 2-AR is ubiquitylated within 15 min of isoproterenol stimulation, ultimately leading to receptor degradation [30]. β 2-AR ubiquitylation requires β -Arr2 and the ubiquitin ligase MDM2, which turned out to ubiquitylate β -Arr2 rather than β 2-AR (see below) [30]. A mutant β 2-AR lacking the ubiquitylation sites (β 2-AR^{K0}) is normally internalized, but not degraded [30]. In contrast, a translational fusion of ubiquitin to the β 2-AR, which mimics its constitutive ubiquitylation, is internalized similarly as the wild-type β 2-AR, but is degraded more efficiently [24].

Therefore, ubiquitylation is a critical signal for β 2-AR degradation upon stimulation. A similar implication of GPCR ubiquitylation in its degradation, but not in its internalization, was also reported in the case of CXCR4 [63]. The identity of the ubiquitin ligase responsible for β 2-AR ubiquitylation was revealed more recently. Indeed, β -Arr2 was found to interact with the HECT-type (homologous to E6-AP C-terminus) ubiquitin ligase Nedd4 (discussed below in this paper). Nedd4 (neural precursor cell expressed developmentally downregulated protein 4) promotes β 2-AR ubiquitylation at endosomes, leading to its lysosomal targeting [24].

Once internalized, GPCRs can also escape degradation and recycle back to the plasma membrane in a functional state to mediate further signaling. Because GPCR ubiquitylation appears to trigger its degradation, deubiquitylation could regulate GPCR recycling to the plasma membrane.

Indeed, two deubiquitylating enzymes named USP33 and USP20 regulate β 2-AR deubiquitylation, recycling and resensitization [35, 37]. USP33 was first identified as a β -arrestin interactant, thus suggesting that β -Arr2 could be involved in USP33 recruitment to β 2-AR [35]. However, USP33 was found to interact with β 2-AR even before agonist stimulation, that is, when β -Arr2 is not yet translocated to the plasma membrane [37]. In fact, USP33 appears to be transferred from agonist-activated β 2-AR to β -Arr2, thus triggering its deubiquitylation and dissociation from the receptor, once internalized. Reassociation of USP33 with β 2-AR in endosomal compartments would regulate its deubiquitylation and recycling to the plasma membrane. Thus, the association and dissociation of β -Arr2 from β 2-AR may coordinate the ubiquitin conjugating/deconjugating activities towards β 2-AR to tune the balance between receptor degradation and recycling. This positions the ubiquitin ligase adaptor function of β -Arr2 as a key regulator of GPCR signaling.

3.3. β -Arrestins as Ubiquitin Ligase Adaptors: Other Examples.

The function of β -arrestins as ubiquitin ligase adaptors is not restricted to β 2-AR. Additional studies identified β -arrestins as ubiquitin ligase adaptors for non-GPCR proteins: β -Arr1, as β -Arr2, acts as an adaptor for ubiquitin ligases of the Nedd4 family such as Itch/AIP4 (Atrophin-1-interacting protein 4) for ubiquitylation of the TRPV4 (transient receptor potential) channel [64], and Nedd4 for that of the Na⁺/H⁺ exchanger 1 (NHE1) [65]. In the latter case, however, and in contrast to the situation described for the β 2-AR, cargo ubiquitylation is required for its internalization. Because β -arrestins interact with both ubiquitin ligase and clathrin (see above), they may then act at two levels: first, for cargo ubiquitylation, which could recruit Eps15/Epsin endocytic adaptors, and, second, to assist the latter in the recruitment of a clathrin coat.

The contribution of β -arrestins to the trafficking of another classical GPCR, the chemokine receptor, CXCR4, was also studied. Early reports had shown that the ligand-induced ubiquitylation of CXCR4 by the Nedd4-like ubiquitin ligase AIP4 is required for its lysosomal sorting [63, 66]. β -Arr1 interacts with AIP4 at endosomes, and knockdown experiments revealed that β -Arr1 is an important player in CXCR4 degradation but, surprisingly, is not required for its ubiquitylation [67]. Instead, CXCR4 is phosphorylated at the plasma membrane after ligand binding, which allows the direct recruitment of the ubiquitin ligase AIP4 via its WW domains, and hence CXCR4 ubiquitylation [68]. β -Arr1 was later found to interact with the ESCRT-0 complex and to direct the ubiquitylation of one of its components, HRS (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) in a CXCR4-dependent manner [69].

Interestingly, β -arrestins appear to act primarily as adaptors for ubiquitin ligase of the Nedd4 family. These enzymes display WW domains that can interact with specific proline-rich motifs (usually, a [L/P]PxY sequence). Although this motif is sometimes present on the targeted substrates, as in the case of ENaC [70], in most cases this interaction

motif is present on an adaptor protein in charge of substrate recognition [71]. However, no PPxY motif has been found in β -arrestins, and polyproline regions are not involved in Nedd4 interaction [24]. In addition, Nedd4 recruitment to β 2-AR was not affected by mutations in Nedd4 WW domains. This indicates that this interaction involves a noncanonical binding of β -Arr2 to Nedd4, for which the molecular determinants remain to be addressed.

In some cases, β -arrestins act as adaptors for ubiquitin ligase which do not belong to the Nedd4 family. β -Arr1 was proposed to act as an adaptor for the RING (Really interesting new gene) ubiquitin ligase Mdm2 to mediate insulin-like growth factor I (IGF-1) receptor ubiquitylation and downregulation [72, 73]. A similar role was appointed to β -Arr2 for the ubiquitylation of the androgen receptor [74]. Again, the molecular basis of this interaction awaits further investigations.

4. Arrestin-Related Proteins: New Players in the Field

Visual and β -arrestins share a similar structure, with an arrestin fold in their N-terminal domains and a C-terminal tail [75–80]. It was proposed that visual and β -arrestins actually originate from an ancestral arrestin family from which they diverged relatively recently [25]. This ancestral family would also have given rise to proteins whose expression is not limited to metazoans: members of the Vps26 family, which display an arrestin-like fold [81, 82], as well as arrestin-related proteins (also coined α -arrestins) [25]. Indeed, proteins displaying sequence homologies to arrestins were first identified in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*, named CreD [83] and PalF [31], and more recent work in yeast allowed to identify additional members of this protein family renamed “ART” (arrestin-related trafficking adaptors) [34, 84, 85] that will be discussed later in this paper. In human, the ART family is composed of six members, named arrestin-domain containing 1–5 (ARRDC1–5) and TXNIP (Thioredoxin-interacting protein) (Figure 1). Therefore, arrestin-related proteins are expressed in all eukaryotes, except plants, which interestingly do not harbor Nedd4-like genes either [25].

4.1. Arrestin-Related Proteins as Endocytic Adaptors. A main difference between visual/ β -arrestins and arrestin-related proteins is that the latter possess PPxY motifs (Figure 1). In agreement with the reported function of these motifs (see above), many studies have documented the ability of yeast arrestin-related proteins to interact with the only Nedd4-like ubiquitin ligase in *S. cerevisiae*, named Rsp5 [33, 34, 85–90]. Rsp5 is critical for ubiquitin-dependent intracellular trafficking pathways, such as endocytosis and MVB sorting [91]. However, most of the transporters lack PPxY motifs, and until recently, the molecular basis for the interaction between Rsp5 and transporters was unknown. It has become clear that yeast arrestin-related proteins fulfill this function, by acting as Rsp5 adaptors to mediate ubiquitylation and subsequent endocytosis of transporters

[33, 34, 84, 85, 90]. Using a chemical-genetic screen, Emr and colleagues have identified Ldb19/Art1 as a regulator of the endocytosis of Can1, an arginine transporter [34]. The function of Ldb19/Art1 was also extended to the endocytosis of other amino acid transporters. In a parallel study, Nikko et al. showed that two other arrestin-related proteins, named Ecm21/Art2 and Csr2/Art8, are specifically involved in the downregulation of the manganese transporter Smf1 [85]. Altogether, around 10 arrestin-related proteins were identified in yeast [34, 84, 85], and gathered in a family referred to as “ART” (arrestin-related trafficking adaptors).

Contrary to the situation in mammalian cells, where β -arrestins mainly act at a late step in cargo sorting, studies in yeast suggested a role for arrestin-related proteins in cargo internalization at the plasma membrane [27]. Indeed, several yeast ARTs are involved in the signal-induced internalization of transporters in response to specific environmental signals [33, 34, 84, 85, 90]. In addition, Art1 relocates to the plasma membrane in response to the signal that induces amino acid transporter endocytosis [34, 92].

However, as for β -arrestins, the situation is probably more complex, and the role of ARTs in endocytosis may not be restricted to the plasma membrane. In the course of their study of the high-affinity iron-uptake protein complex Fet3/Ftr1 in yeast, Burd and colleagues documented an example of ubiquitin-independent internalization [43]. The results show that a nonubiquitylatable form of Fet3/Ftr1 can still be internalized but is constitutively recycled back to the plasma membrane, leading to an apparent defect in internalization. Although the involvement of an arrestin remains to be determined, it strongly suggests that in this system, cargo ubiquitylation by Rsp5 is required at endosomal compartments, rather than at the plasma membrane. In addition, two yeast arrestin-related proteins, Aly1/Art6 and Aly2/Art3, have been shown to localize to intracellular compartments and to control the trafficking of the general amino-acids transporter Gap1 between trans-Golgi and endosomes [93]. Consistent with these findings, Aly1 and Aly2 interact with both clathrin and Golgi-specific clathrin adaptor complex AP-1, thus suggesting that arrestin related proteins, as β -arrestins, promote clathrin-coat assembly and cargo targeting to clathrin-coated vesicles. Therefore, future studies will be necessary to precise where yeast arrestin-related proteins act on cargo trafficking. Regarding their intracellular localizations, we can already hypothesize several modes of action within the ART family of proteins.

Like their yeast homologs, several human ARRDC proteins are able to interact with ubiquitin ligases of the Nedd4 family [94–97]. Among those, ARRDC3 was isolated in a screen designed to identify proteins involved in β 2-AR ubiquitylation and degradation after agonist treatment [95]. ARRDC3, as β -Arr2 [24], was shown to bridge the interaction between Nedd4 and β 2-AR, leading to the intriguing possibility that arrestin-related proteins might coordinate, together with β -arrestins, receptor ubiquitylation and degradation. Because both classes of arrestins have the ability to dimerize [94, 98], this raises the possibility of potential heterooligomers between arrestin and arrestin-related proteins that

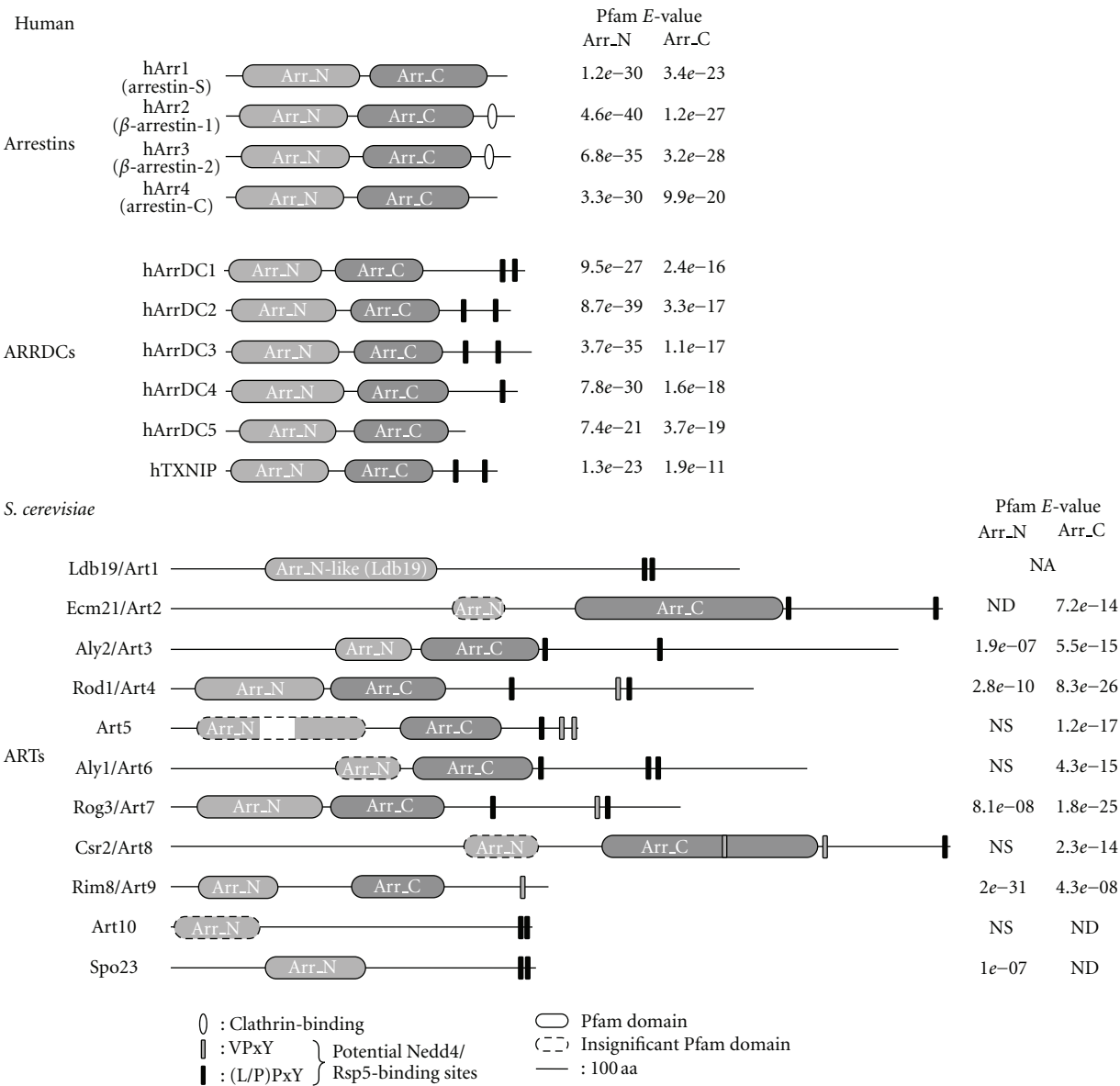


FIGURE 1: Schematic representation of the domain organization of human arrestins and arrestin-domain containing (ARRDC) proteins, and yeast ARTs (arrestin-related trafficking adaptors). Domains detected by Pfam 26.0 (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) are shown and correspond to the following Pfam-A accessions: Arr_N: PF00339, Arr_C: PF02752, Arr_N-like (Ldb19): PF13002, along with the corresponding E-values for each domain (NA: not applicable; ND: not detected; NS: not significant). A putative Arr_N domain in Ecm21/Art2 was identified by alignment with the presumed Arr_N domain of Csr2/Art8. Clathrin-binding sites are depicted on β -arrestins; potential binding sites for ubiquitin ligases of the Nedd4 family are also indicated on arrestin-related proteins.

could reveal a complementary role between arrestin classes.

The basic function of arrestin-related proteins as ubiquitin ligase adaptor therefore seems strongly conserved. Of note, a role for ARRDC3 in the degradation of a cell surface adhesion molecule, integrin β 4, was also pointed out, but its role as ubiquitin ligase adaptor in this context has not been investigated [99]. Future studies will indubitably unravel new connections between ubiquitin and arrestin-related proteins.

4.2. Other Functions of Arrestin-Related Proteins: An ESCRT Connection. As previously mentioned, arrestin-related proteins were initially identified in *A. nidulans* and named CreD [83] and PalF [31]. Interestingly, in both cases, a connection with the ubiquitin pathway was established. CreD was shown to interact physically with the Nedd4 homologue in *A. nidulans*, HulA, whereas PalF was found to be ubiquitinated in vivo. PalF, a protein involved in the ambient pH signaling in fungi, binds to the seven-transmembrane and putative

pH sensor, PalH. This pointed out to many similarities between mammalian β -arrestins and this arrestin-related protein [31].

As in *A. nidulans*, the yeast PalF homologue Rim8/Art9 is essential for the proteolytic activation of the pH-responsive transcription factor, Rim101, in response to neutral-alkaline pH [100]. Interestingly, there is an intricate connection between the ESCRT machinery, involved in ubiquitin-dependent cargo sorting at the MVB, and this signaling pathway [100–102]. The ART Rim8/Art9 is central to the coordination of the ESCRT machinery and the pH-signaling pathway, as it interacts with both the putative pH sensor Rim21 and the ESCRT-I subunit Vps23 [89]. ESCRT appears to provide a platform for recruitment of a protein complex containing the ESCRT-III binding protein and ALIX homologue Rim20, that enables the proteolytic activation of the Rim101 transcription factor in response to the pH signal. Although initial studies suggested that this process takes place at the endosomal membrane [103], subsequent work supported the idea that arrestin-mediated recruitment of ESCRT in the fungal ambient pH signaling pathway may occur at the plasma membrane [89, 104]. Similarly, some of the human ARRDCs interact with the Vps23 homologue TSG101 or the ESCRT-associated protein ALIX [90, 96]. In particular, ARRDC1-mediated recruitment of ESCRT appears to drive the formation of microvesicles at the plasma membrane that may be involved in intercellular communication [94, 105]. Interestingly, this situation is reminiscent of the budding step of different enveloped RNA viruses, which recruit ESCRT components through similar interactions to promote membrane scission and subsequent viral particle release [106]. Accordingly, overexpression of several ARRDCs inhibits murine leukemia virus (MLV) viral particle release in a PPxY-specific way [96]. Therefore, ARRDCs may act as adaptors between Nedd4-like enzymes and the ESCRT machinery, in viral budding.

Finally, the connection between arrestin and the ESCRT machinery may not be restricted to arrestin-related proteins. Indeed, and as previously mentioned, β -Arr1 was found to interact with STAM-1 (signal-transducing adaptor molecule), a component of ESCRT-0, to regulate endosomal sorting of CXCR4 [69].

5. Regulation of Arrestin Function by Ubiquitin

5.1. Regulation of β -Arrestins by Ubiquitylation. Arrestins are specifically recruited to the cargoes following agonist stimulation (receptor) or in response to the presence of the substrate (transporter, channel), thus suggesting that they are regulated to mediate an adapted response of the cell to extracellular changes.

As mentioned previously, Shenoy and colleagues showed in a seminal article that β -Arr2 is itself ubiquitylated in response to agonist treatment [30]. Ubiquitylation of β -Arr2, in contrast to that of β 2-AR, does not require Nedd4, but an ubiquitin ligase of the RING family, Mdm2. As this modification occurred upon stimulation, this suggested a role for β -Arr2 ubiquitylation in β -AR trafficking. Indeed,

Mdm2 knockdown caused a defect in β 2-AR internalization. Thus, β -Arr2 ubiquitylation appears to play a key role in GPCR trafficking, and several lines of evidences support this idea.

To address directly the importance of this posttranslational modification and to avoid potential indirect effects of the knockdown of the Mdm2 ubiquitin ligase on β 2-AR trafficking, studies were performed using both a nonubiquitylatable mutant form of β -Arr2 (β -Arr2^{0K}) and a translational fusion of ubiquitin to β -Arr2 (β -Arr2-Ub) [107]. These experiments showed that β -Arr2^{0K} recruitment to the plasma membrane was only transient and unable to trigger internalization of β 2-AR. On the opposite, translational fusion of ubiquitin to β -Arr2 led to its co-trafficking with β 2-AR into endosomal compartments [107]. Previous observations had classified GPCRs in two classes (A and B), based on the interaction pattern between receptor and β -arrestin. Interaction of β -arrestin with class A receptors (e.g., β 2-AR) only takes place at the plasma membrane, while its interaction with class B receptors (e.g., angiotensin II type 1a receptor: AT1aR, or vasopressin V2 receptor: V2R) is more stable and persists even after receptor internalization [108]. Interestingly, the increased stability of the interaction between class B receptors and β -arrestin correlates with a sustained β -arrestin ubiquitylation, which is not observed with class A receptors [36]. Indeed, even if β -Arr2^{K0} is able to interact with the receptor *in vitro*, this interaction is weaker than that displayed with the wild type form *in vivo*. On the opposite, translational fusion of ubiquitin to β -Arr2 displays a stronger binding than wild type β -Arr2 [107]. β -Arr2 ubiquitylation therefore appears to reinforce the interaction with β 2-AR.

Because β -Arr2 is capable of interacting with the endocytic machinery, such as clathrin or clathrin adaptors, the failure of β -Arr2^{K0} to promote β 2-AR internalization could originate from an impaired interaction with these components. Indeed, β -Arr2^{K0} exhibits a weaker interaction with clathrin than the wild-type form [107]. While clathrin is not known to interact with ubiquitin, β -Arr2 ubiquitylation might stabilize the interaction with clathrin through other components of the endocytic machinery such as Eps15/epsin proteins that are able to bind both ubiquitin and clathrin.

β -Arr2 ubiquitylation was also shown to affect its scaffolding function for signaling proteins. The amplitude of β -arrestin-mediated activation of ERK (extracellular signal-regulated kinase) correlates with the β -Arr2 ubiquitylation status. Although β -Arr2 ubiquitylation was not required for its interaction with MAP kinases (such as c-Raf and ERK), translational fusion of ubiquitin to β -Arr2 led to an increased level of ERK activity in endosome localized receptor complexes (signalosomes). Consistent with these findings, β -arrestin ubiquitylation promote its association with membrane. Again, ubiquitylation appears to function in stabilizing the β -arrestin-mediated interaction between the receptor and signaling proteins [107].

Finally, arrestins undergo conformational changes upon binding to activated receptors [109]. Ubiquitin modification

could therefore contribute to the proper rearrangement of the β -arrestin structure, leading to optimal interactions with its partners, and this awaits further investigations.

5.2. Regulation of Arrestin-Related Protein by Ubiquitylation. Many arrestin-related proteins have also been reported as substrates for ubiquitylation, both in fungi and human [31, 33, 34, 89, 90, 94, 96, 97, 110]. Ubiquitylation of these proteins, in contrast to that of β -arrestins, is triggered by ubiquitin ligases of the Nedd4 family. Therefore, arrestin-related proteins are adaptors as well as targets of the same ubiquitin ligases.

The yeast arrestin-related protein Ldb19/Art1 is required for the endocytosis of amino acid permeases, such as the arginine transporter, Can1. Failure to endocytose Can1 leads to sensitivity of the cells to canavanine, a toxic analog of arginine. A nonubiquitylatable mutant of Ldb19/Art1 cannot grow on this drug, suggesting that Can1 remains at the plasma and therefore that Art1 is not functional [34]. The importance of ubiquitylation for ART function was also demonstrated for Rod1/Art4, involved in the glucose-induced endocytosis of carbon sources transporters [33, 84]. Rod1/Art4 is ubiquitylated in response to glucose exposure and a nonubiquitylatable mutant is unable to promote the endocytosis of the lactate transporter, Jen1, following glucose treatment [33]. Altogether, these data indicate that ART ubiquitylation is crucial for their function in endocytosis. Human arrestin-related protein ARRDC3 was isolated in a screen designed to identify genes involved in β 2-AR degradation, and acts as a Nedd4 adaptor for β 2-AR ubiquitylation [95]. While ARRDC3 ubiquitylation has not yet been observed, ARRDC1 and TXNIP were shown to be ubiquitylated by ubiquitin ligases of the Nedd4 family [90, 96, 97]. Thus, it is tempting to speculate that the same regulation applies in fungi and human.

The ubiquitylation of the arrestin-related protein PalF in *A. nidulans* is triggered in a signal-(alkaline pH) and receptor-(PalH) dependent manner [31]. PalF ubiquitylation appears as a major determinant of its activity, since the translational fusion of ubiquitin to PalF leads to a constitutive activation of the pathway [110]. The yeast PalF homologue Rim8/Art9 was shown to be monoubiquitylated [89]. Monoubiquitylation of Rim8/Art9 occurs on a lysine residue in its C-terminus and, as for all other ARTs described to date in yeast, is performed by Rsp5, which binds to a PxY motif near the ubiquitylation site. This monoubiquitylated residue, together with a SxP motif, contributes to the interaction of Rim8/Art9 with the ESCRT-I subunit Vps23 via its ubiquitin-binding domain, UEV (ubiquitin E2 variant) [89]. Interestingly, Vps23 binding appears to control the levels of monoubiquitylated Rim8/Art9, thus suggesting that this interaction either promotes Rim8 ubiquitylation or prevents its further polyubiquitylation and possibly its degradation. Interaction of human ARRDC1 with the Vps23 homologue Tsg101 was shown to be mediated by a PSAP motif which, like the SxP motif in Rim8, is located at the protein C-terminus [94, 96]. In addition, it was proposed that the ubiquitylation of ARRDC1 is important for its function [94].

However, this is based on results obtained upon depletion of the corresponding Nedd4-like ligase WWP1, which in principle could also impair a potential adaptor function and may have off-target effects. Therefore, the identification and mutation of the ubiquitylation sites will be critical to address this question.

5.3. Dynamic Regulation of Arrestin Ubiquitylation. Phosphorylation-Dependent Ubiquitylation? Because ubiquitin ligases target a large number of proteins in the cell, their activity toward a given substrate is usually indirectly regulated through substrate accessibility, either by the use of adaptor proteins, or by post-translational modification of the substrate, such as phosphorylation [111].

Interestingly, cytosolic β -arrestins are constitutively phosphorylated, and undergo dephosphorylation upon binding to the activated receptor. β -Arr1 dephosphorylation is required for β 2-AR internalization, but not for its desensitization [112]. Indeed, a β -Arr1 mutant mimicking constitutive phosphorylation displays a weaker interaction with clathrin but an unaltered β 2-AR binding [112]. Similar data were reported for β -Arr2, and the phosphorylation site was localized near the clathrin and AP-2 binding motifs, thus providing an explanation as to why β -Arr2 phosphorylation regulates the interaction with clathrin/AP-2 [113]. Additionally, the phosphorylation of the major visual arrestin in *Drosophila* (Arr2) also regulates its interaction with clathrin [114].

Importantly, once the receptor is internalized, β -Arr1 is rephosphorylated. These dynamic phosphorylation/dephosphorylation events suggest the involvement of kinases and phosphatases whose activation is coordinated in response to agonist exposure. Interestingly, β -Arr1 is phosphorylated *in vitro* by ERK kinases and accordingly, the modulation of ERK activity *in vivo* affects β -Arr1 phosphorylation, thus providing an inhibitory feedback control of its function [115].

Although β -arrestins are both dephosphorylated and ubiquitylated upon receptor binding, an eventual relationship between these two modifications remained to be addressed. Such a link has been described for the yeast arrestin-related protein Rod1/Art4, involved in the glucose-induced endocytosis of carbon sources transporters [33]. As for β -arrestins, Rod1/Art4 dephosphorylation and ubiquitylation occurs in response to an external signal-in this case, glucose. The yeast homologue of AMPK (5'-AMP-activated protein kinase), Snf1, and its counteracting phosphatase PP1 (protein phosphatase 1) control the phosphorylation status of Art4/Rod1 in response to glucose availability. Therefore, in the absence of glucose, Art4/Rod1 is phosphorylated and endocytosis is inhibited. This inhibitory effect results from the ability of phosphorylated Art4/Rod1 to bind 14-3-3 proteins, thereby hindering its ubiquitylation by Rsp5 and hence preventing its activation [33].

Interestingly, phosphorylation of another yeast arrestin-related protein, Ldb19/Art1, also regulates its function. A recent study indicated that Ldb19/Art1 is subject to

phosphoinhibition through the action of the TOR (target of rapamycin) effector and protein kinase Npr1, thus allowing cells to regulate amino acid transporter endocytosis in response to the nitrogen status [92]. While the overall phospho-inhibition mechanism recalls that of Rod1/Art4, Ldb19/Art1 ubiquitylation is uncoupled from its phosphorylation, suggesting a different regulatory mechanism [34]. The identification of Npr1-dependent phosphorylation sites on Ldb19/Art1 allowed generating a nonphosphorylatable mutant form of the protein. Interestingly, this mutant fails to be translocated at the plasma membrane upon stimulation, which likely explains why transporters endocytosis is impaired [92]. Further work will be needed to understand the molecular mechanism of this phosphorylation-dependent inhibition.

Other examples of arrestin-related proteins that are subjected to phosphorylation which include *A. nidulans* PalF, involved in ambient pH sensing, although the regulatory mechanism appears to be different since PalF undergoes phosphorylation instead of dephosphorylation, in response to the ambient pH signal [31]. The same result has been observed in the pathogenic yeast *Candida albicans*, where the PalF homologue Rim8 is also phosphorylated in response to neutral-alkaline pH [116]. Although phosphorylation of Rim8/Art9 in baker's yeast has not been reported, its ubiquitylation does not appear to be regulated by ambient pH, in contrast to that of PalF, which is induced by alkaline pH [89]. The apparent lack of regulation of Rim8/Art9 ubiquitylation is consistent with its role in Vps23 binding, which appears to occur even in nonstimulated conditions. Thus, the pH-dependent regulation of PalF ubiquitylation in *A. nidulans* may reflect an additional level of regulation in this organism.

From these studies, it emerges that arrestin-related proteins are often modified posttranslationally in response to stimulation, either by phosphorylation, ubiquitylation, or both. A crosstalk between phosphorylation and ubiquitylation has been evidenced. How these modifications operate to coordinate arrestin function is unknown, and this provides new avenues for research in this field.

Ubiquitylation and deubiquitylation. Ubiquitylation, akin to phosphorylation, is a reversible process. Therefore, deubiquitylation appeared as a possible mechanism for regulation of arrestin function. In support of this idea, the transient β -Arr2 ubiquitylation associated to class A receptor suggested that deubiquitylation occurs rapidly after agonist stimulation. Indeed, the ubiquitin-specific protease 33 (USP33) was shown to deubiquitylate β -Arr2 following β 2-AR binding [35]. USP33 knock-down led to an increase in β -Arr2 ubiquitylation. This was accompanied by a stronger interaction with the receptor, and a prolonged β -Arr2-dependent MAP kinase signaling. These findings are consistent with the phenotypes of cells expressing a translational fusion of ubiquitin to β -Arr2 (see above) and provide an additional mechanism for the regulation of arrestin function. Strikingly, recruitment of USP33 to β -Arr2 depends on the receptor class, in agreement with previous finding that receptor class determines the kinetics of β -Arr2 deubiquitylation [36]. In addition, receptors belonging to the

same class can target different lysine residues on β -Arr2 for ubiquitylation [32]. Therefore, binding of β -Arr2 to different receptors may trigger distinct conformational change that could modulate both ubiquitylation sites accessibility and association with deubiquitylating enzymes, hence leading to a different functional output—in full support of the concept of an “ubiquitylation code.”

6. Concluding Remarks

In this paper, we emphasized the many relationships between ubiquitin metabolism and arrestin biology. Many proteins of the arrestin family act as ubiquitin ligase adaptors and are required for ubiquitylation of endocytic cargo. In particular, recent data obtained on arrestin-related proteins have pointed out several features shared with β -arrestins, such as the intimate connection existing between these proteins and ubiquitin ligases of the Nedd4 family. In addition, ubiquitin also regulates arrestin function in a yet undefined way, which is now critical to understand. However, the emergence of new regulatory mechanisms involving a now expanded family of arrestin proteins, combined with the multiplicity of model organisms, is likely to favor the rapid evolution of concepts in arrestin biology.

Abbreviations

AIP4:	Atrophin-interacting protein 4
AP-1/AP-2:	Clathrin adaptor protein
ARRDC:	Arrestin-domain Containing
ART:	Arrestin-related trafficking adaptors
β -Arr:	β -arrestin
β 2-AR:	β 2-adrenergic receptor
ERK:	Extracellular signal-regulated Kinase
ESCRT:	Endosomal sorting complex required for transport
GPCRs:	G-protein-coupled receptors.
MAP:	Mitogen-activated protein
MVBs:	Multivesicular bodies
Nedd4:	Neural precursor cell expressed developmentally downregulated protein 4
RING:	Really interesting new gene
TXNIP:	Thioredoxin-interacting protein.

Acknowledgments

This work was supported by the CNRS and by a Grant from the Fondation ARC pour la recherche sur le cancer (SFI20101201844) to S. Léon, and by a Grant from the Spanish CICYT (BFU2008-02005) to O. Vincent. M. Becuwe and A. Herrador are recipients of Ph.D. fellowships from the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and from CSIC-JAE, respectively.

References

- [1] U. Wilden, S. W. Hall, and H. Kuhn, “Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa

- protein of rod outer segments," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 83, no. 5, pp. 1174–1178, 1986.
- [2] R. Zuckerman and J. E. Cheasty, "A 48 kDa protein arrests cGMP phosphodiesterase activation in retinal rod disk membranes," *FEBS Letters*, vol. 207, no. 1, pp. 35–41, 1986.
 - [3] V. V. Gurevich, S. M. Hanson, X. Song, S. A. Vishnivetskiy, and E. V. Gurevich, "The functional cycle of visual arrestins in photoreceptor cells," *Progress in Retinal and Eye Research*, vol. 30, no. 6, pp. 405–430, 2011.
 - [4] J. L. Benovic, H. Kühn, I. Weyand, J. Codina, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz, "Functional desensitization of the isolated β -adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein)," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 84, no. 24, pp. 8879–8882, 1987.
 - [5] M. J. Lohse, J. L. Benovic, J. Codina, M. G. Cargon, and R. J. Lefkowitz, " β -arrestin: a protein that regulates β -adrenergic receptor function," *Science*, vol. 248, no. 4962, pp. 1547–1550, 1990.
 - [6] H. Attramadal, J. L. Arriza, C. Aoki et al., " β -arrestin2, a novel member of the arrestin/ β -arrestin gene family," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, no. 25, pp. 17882–17890, 1992.
 - [7] S. M. DeWire, S. Ahn, R. J. Lefkowitz, and S. K. Shenoy, " β -arrestins and cell signaling," *Annual Review of Physiology*, vol. 69, pp. 483–510, 2007.
 - [8] V. V. Gurevich and E. V. Gurevich, "The molecular acrobatics of arrestin activation," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 25, no. 2, pp. 105–111, 2004.
 - [9] A. C. Hanyaloglu and M. von Zastrow, "Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications," *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 48, pp. 537–568, 2008.
 - [10] C. A. C. Moore, S. K. Milano, and J. L. Benovic, "Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins," *Annual Review of Physiology*, vol. 69, pp. 451–482, 2007.
 - [11] J. G. Krupnick, O. B. Goodman Jr., J. H. Keen, and J. L. Benovic, "Arrestin/clathrin interaction. Localization of the clathrin binding domain of nonvisual arrestins to the carboxyl terminus," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 23, pp. 15011–15016, 1997.
 - [12] O. B. Goodman Jr., J. G. Krupnick, F. Santini et al., " β -arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the β_2 -adrenergic receptor," *Nature*, vol. 383, no. 6599, pp. 447–450, 1996.
 - [13] O. B. Goodman Jr., J. G. Krupnick, V. V. Gurevich, J. L. Benovic, and J. H. Keen, "Arrestin/clathrin interaction. Localization of the arrestin binding locus to the clathrin terminal domain," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 23, pp. 15017–15022, 1997.
 - [14] Y. M. Kim and J. L. Benovic, "Differential roles of arrestin-2 interaction with clathrin and adaptor protein 2 in G protein-coupled receptor trafficking," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 34, pp. 30760–30768, 2002.
 - [15] S. A. Laporte, W. E. Miller, K. M. Kim, and M. G. Caron, " β -arrestin/AP-2 interaction in G protein-coupled receptor internalization. Identification of a β -arrestin binding site β_2 -adapting," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 11, pp. 9247–9254, 2002.
 - [16] S. A. Laporte, R. H. Oakley, J. Zhang et al., "The β_2 -adrenergic receptor/ β -arrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 7, pp. 3712–3717, 1999.
 - [17] M. A. Edeling, S. K. Mishra, P. A. Keyel et al., "Molecular switches involving the AP-2 β_2 appendage regulate endocytic cargo selection and clathrin coat assembly," *Developmental Cell*, vol. 10, no. 3, pp. 329–342, 2006.
 - [18] A. Claing, W. Chen, W. E. Miller et al., " β -arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and β_2 -Adrenergic receptor endocytosis," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 45, pp. 42509–42513, 2001.
 - [19] P. H. McDonald, N. L. Cote, F. T. Lin, R. T. Premont, J. A. Pitcher, and R. J. Lefkowitz, "Identification of NSF as a β -arrestin1-binding protein: implications for β_2 -adrenergic receptor regulation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 16, pp. 10677–10680, 1999.
 - [20] C. D. Nelson, J. J. Kovacs, K. N. Nobles, E. J. Whalen, and R. J. Lefkowitz, " β -arrestin scaffolding of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase $I\alpha$ promotes agonist-stimulated sequestration of the β_2 -adrenergic receptor," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 30, pp. 21093–21101, 2008.
 - [21] L. M. Luttrell and D. Gesty-Palmer, "Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling," *Pharmacological Reviews*, vol. 62, no. 2, pp. 305–330, 2010.
 - [22] F. Acconcia, S. Sigismund, and S. Polo, "Ubiquitin in trafficking: the network at work," *Experimental Cell Research*, vol. 315, no. 9, pp. 1610–1618, 2009.
 - [23] S. Polo, "Signaling-mediated control of ubiquitin ligases in endocytosis," *BMC Biology*, vol. 10, article 25, 2012.
 - [24] S. K. Shenoy, K. Xiao, V. Venkataramanan, P. M. Snyder, N. J. Freedman, and A. M. Weissman, "Nedd4 mediates agonist-dependent ubiquitination, lysosomal targeting, and degradation of the β_2 -adrenergic receptor," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 32, pp. 22166–22176, 2008.
 - [25] C. E. Alvarez, "On the origins of arrestin and rhodopsin," *BMC Evolutionary Biology*, vol. 8, no. 1, article 222, 2008.
 - [26] L. Aubry, D. Guetta, and G. Klein, "The arrestin fold: variations on a theme," *Current Genomics*, vol. 10, no. 2, pp. 133–142, 2009.
 - [27] S. Polo and P. P. di Fiore, "Finding the right partner: science or ART?" *Cell*, vol. 135, no. 4, pp. 590–592, 2008.
 - [28] A. K. Shukla, K. Xiao, and R. J. Lefkowitz, "Emerging paradigms of β -arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 36, no. 9, pp. 457–469, 2011.
 - [29] S. K. Shenoy and R. J. Lefkowitz, " β -arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 32, no. 9, pp. 521–533, 2011.
 - [30] S. K. Shenoy, P. H. McDonald, T. A. Kohout, and R. J. Lefkowitz, "Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated β_2 -adrenergic receptor and β -arrestin," *Science*, vol. 294, no. 5545, pp. 1307–1313, 2001.
 - [31] S. Herranz, J. M. Rodríguez, H. J. Bussink et al., "Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 34, pp. 12141–12146, 2005.
 - [32] S. K. Shenoy and R. J. Lefkowitz, "Receptor-specific ubiquitination of β -arrestin directs assembly and targeting of seven-transmembrane receptor signalosomes," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 15, pp. 15315–15324, 2005.
 - [33] M. Becuwe, N. Vieira, D. Lara et al., "A molecular switch on an arrestin-like protein relays glucose signaling to transporter endocytosis," *Journal of Cell Biology*, vol. 196, no. 2, pp. 247–259, 2012.

- [34] C. H. Lin, J. A. MacGurn, T. Chu, C. J. Stefan, and S. D. Emr, "Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface," *Cell*, vol. 135, no. 4, pp. 714–725, 2008.
- [35] S. K. Shenoy, A. S. Modi, A. K. Shukla et al., " β -arrestin-dependent signaling and trafficking of 7-transmembrane receptors is reciprocally regulated by the deubiquitinase USP₃₃ and the E₃ ligase Mdm2," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 16, pp. 6650–6655, 2009.
- [36] S. K. Shenoy and R. J. Lefkowitz, "Trafficking patterns of β -arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of β -arrestin deubiquitination," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 16, pp. 14498–14506, 2003.
- [37] M. Berthouze, V. Venkataramanan, Y. Li, and S. K. Shenoy, "The deubiquitinases USP33 and USP20 coordinate β 2 adrenergic receptor recycling and resensitization," *The EMBO Journal*, vol. 28, no. 12, pp. 1684–1696, 2009.
- [38] R. Kolling and C. P. Hollenberg, "The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants," *The EMBO Journal*, vol. 13, no. 14, pp. 3261–3271, 1994.
- [39] L. Hicke and H. Riezman, "Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis," *Cell*, vol. 84, no. 2, pp. 277–287, 1996.
- [40] A. F. Roth and N. G. Davis, "Ubiquitination of the yeast a-factor receptor," *Journal of Cell Biology*, vol. 134, no. 3, pp. 661–674, 1996.
- [41] J. M. Galan, V. Moreau, B. Andre, C. Volland, and R. Haguenauer-Tsapis, "Ubiquitination mediated by the Npi1p/Rsp5p ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no. 18, pp. 10946–10952, 1996.
- [42] E. Lauwers, Z. Erpapazoglou, R. Haguenauer-Tsapis, and B. André, "The ubiquitin code of yeast permease trafficking," *Trends in Cell Biology*, vol. 20, no. 4, pp. 196–204, 2010.
- [43] T. I. Strohlic, B. C. Schmiedekamp, J. Lee, D. J. Katzmann, and C. G. Burd, "Opposing activities of the snx3-retromer complex and ESCRT proteins mediate regulated cargo sorting at a common endosome," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 19, no. 11, pp. 4694–4706, 2008.
- [44] L. M. Traub, "Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 10, no. 9, pp. 583–596, 2009.
- [45] S. C. Shih, D. J. Katzmann, J. D. Schnell, M. Sutanto, S. D. Emr, and L. Hicke, "Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that function in receptor endocytosis," *Nature Cell Biology*, vol. 4, no. 5, pp. 389–393, 2002.
- [46] R. C. Aguilar, H. A. Watson, and B. Wendland, "The yeast epsin Ent1 is recruited to membranes through multiple independent interactions," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 12, pp. 10737–10743, 2003.
- [47] H. Barriere, C. Nemes, D. Lechardeur, M. Khan-Mohammad, K. Fruh, and G. L. Lukacs, "Molecular basis of oligoubiquitin-dependent internalization of membrane proteins in mammalian cells," *Traffic*, vol. 7, no. 3, pp. 282–297, 2006.
- [48] M. Kazazic, V. Bertelsen, K. W. Pedersen et al., "Epsin 1 is involved in recruitment of ubiquitinated EGF receptors into clathrin-coated pits," *Traffic*, vol. 10, no. 2, pp. 235–245, 2009.
- [49] S. Sigismund, T. Woelk, C. Puri et al., "Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 8, pp. 2760–2765, 2005.
- [50] M. R. Does, J. D. Schnell, L. Maldonado-Baez, B. Wendland, and L. Hicke, "The function of yeast epsin and Ede1 ubiquitin-binding domains during receptor internalization," *Traffic*, vol. 11, no. 1, pp. 151–160, 2010.
- [51] K. Haglund, N. Shimokawa, I. Szymkiewicz, and I. Dikic, "Cbl-directed monoubiquitination of CIN85 is involved in regulation of ligand-induced degradation of EGF receptors," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 19, pp. 12191–12196, 2002.
- [52] M. Katz, K. Shtiegman, P. Tal-Or et al., "Ligand-independent degradation of epidermal growth factor receptor involves receptor ubiquitylation and Hgs, an adaptor whose ubiquitin-interacting motif targets ubiquitylation by Nedd4," *Traffic*, vol. 3, no. 10, pp. 740–751, 2002.
- [53] S. Polo, S. Sigismund, M. Faretta et al., "A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins," *Nature*, vol. 416, no. 6879, pp. 451–455, 2002.
- [54] S. B. Shields and R. C. Piper, "How Ubiquitin Functions with ESCRTs," *Traffic*, vol. 12, no. 10, pp. 1306–1317, 2011.
- [55] W. M. Henne, N. J. Buchkovich, and S. D. Emr, "The ESCRT pathway," *Developmental Cell*, vol. 21, no. 1, pp. 77–91, 2011.
- [56] D. J. Katzmann, G. Odorizzi, and S. D. Emr, "Receptor downregulation and multivesicular-body sorting," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 3, no. 12, pp. 893–905, 2002.
- [57] G. J. Strous, P. van Kerkhof, R. Govers, A. Ciechanover, and A. L. Schwartz, "The ubiquitin conjugation system is required for ligand-induced endocytosis and degradation of the growth hormone receptor," *The EMBO Journal*, vol. 15, no. 15, pp. 3806–3812, 1996.
- [58] O. Staub, I. Gautschi, T. Ishikawa et al., "Regulation of stability and function of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) by ubiquitination," *The EMBO Journal*, vol. 16, no. 21, pp. 6325–6336, 1997.
- [59] L. Hicke and R. Dunn, "Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins," *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 19, pp. 141–172, 2003.
- [60] D. Mukhopadhyay and H. Riezman, "Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling," *Science*, vol. 315, no. 5809, pp. 201–205, 2007.
- [61] J. N. Hislop and M. von Zastrow, "Role of ubiquitination in endocytic trafficking of G-protein-coupled receptors," *Traffic*, vol. 12, no. 2, pp. 137–148, 2011.
- [62] A. M. Hommelgaard, K. Roepstorff, F. Vilhardt, M. L. Torgersen, K. Sandvig, and B. van Deurs, "Caveolae: stable membrane domains with a potential for internalization," *Traffic*, vol. 6, no. 9, pp. 720–724, 2005.
- [63] A. Marchese and J. L. Benovic, "Agonist-promoted ubiquitination of the G protein-coupled receptor CXCR4 mediates lysosomal sorting," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 49, pp. 45509–45512, 2001.
- [64] A. K. Shukla, J. Kim, S. Ahn et al., "Arresting a transient receptor potential (TRP) channel: β -arrestin 1 mediates ubiquitination and functional down-regulation of TRPV4," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 39, pp. 30115–30125, 2010.
- [65] A. Simonin and D. Fuster, "Nedd4-1 and β -arrestin-1 are key regulators of Na⁺/H⁺ exchanger 1 ubiquitylation,

- endocytosis, and function," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 49, pp. 38293–38303, 2010.
- [66] A. Marchese, C. Raiborg, F. Santini, J. H. Keen, H. Stenmark, and J. L. Benovic, "The E3 ubiquitin ligase AIP4 mediates ubiquitination and sorting of the G protein-coupled receptor CXCR4," *Developmental Cell*, vol. 5, no. 5, pp. 709–722, 2003.
- [67] D. Bhandari, J. Trejo, J. L. Benovic, and A. Marchese, "Arrestin-2 interacts with the ubiquitin-protein isopeptide ligase atrophin-interacting protein 4 and mediates endosomal sorting of the chemokine receptor CXCR4," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 51, pp. 36971–36979, 2007.
- [68] D. Bhandari, S. L. Robia, and A. Marchese, "The E3 ubiquitin ligase atrophin interacting protein 4 binds directly to the chemokine receptor CXCR4 via a novel WW domain-mediated interaction," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 20, no. 5, pp. 1324–1339, 2009.
- [69] R. Malik and A. Marchese, "Arrestin-2 interacts with the endosomal sorting complex required for transport machinery to modulate endosomal sorting of CXCR4," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 21, no. 14, pp. 2529–2541, 2010.
- [70] O. Staub, S. Dho, P. C. Henry et al., "WW domains of Nedd4 bind to the proline-rich PY motifs in the epithelial Na⁺ channel deleted in Liddle's syndrome," *The EMBO Journal*, vol. 15, no. 10, pp. 2371–2380, 1996.
- [71] S. Léon and R. Haguenauer-Tsapis, "Ubiquitin ligase adaptors: regulators of ubiquitylation and endocytosis of plasma membrane proteins," *Experimental Cell Research*, vol. 315, no. 9, pp. 1574–1583, 2009.
- [72] F. T. Lin, Y. Daaka, and R. J. Lefkowitz, "β-arrestins regulate mitogenic signaling and clathrin-mediated endocytosis of the insulin-like growth factor I receptor," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 48, pp. 31640–31643, 1998.
- [73] L. Girnita, S. K. Shenoy, B. Sehat et al., "β-arrestin is crucial for ubiquitination and down-regulation of the insulin-like growth factor-1 receptor by acting as adaptor for the MDM2 E3 ligase," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 26, pp. 24412–24419, 2005.
- [74] V. Lakshminathan, L. Zou, J. I. Kim et al., "Identification of βArrestin2 as a corepressor of androgen receptor signaling in prostate cancer," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 23, pp. 9379–9384, 2009.
- [75] J. Granzin, U. Wilden, H. W. Choe, J. Labahn, B. Krafft, and G. Buldt, "X-ray crystal structure of arrestin from bovine rod outer segments," *Nature*, vol. 391, no. 6670, pp. 918–921, 1998.
- [76] M. Han, V. V. Gurevich, S. A. Vishnivetskiy, P. B. Sigler, and C. Schubert, "Crystal structure of β-arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane translocation," *Structure*, vol. 9, no. 9, pp. 869–880, 2001.
- [77] J. A. Hirsch, C. Schubert, V. V. Gurevich, and P. B. Sigler, "The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: a model for arrestin's regulation," *Cell*, vol. 97, no. 2, pp. 257–269, 1999.
- [78] S. K. Milano, H. C. Pace, Y. M. Kim, C. Brenner, and J. L. Benovic, "Scaffolding functions of arrestin-2 revealed by crystal structure and mutagenesis," *Biochemistry*, vol. 41, no. 10, pp. 3321–3328, 2002.
- [79] S. K. Milano, Y. M. Kim, F. P. Stefano, J. L. Benovic, and C. Brenner, "Nonvisual arrestin oligomerization and cellular localization are regulated by inositol hexakisphosphate binding," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 14, pp. 9812–9823, 2006.
- [80] R. B. Sutton, S. A. Vishnivetskiy, J. Robert et al., "Crystal structure of cone arrestin at 2.3 Å: evolution of receptor specificity," *Journal of Molecular Biology*, vol. 354, no. 5, pp. 1069–1080, 2005.
- [81] H. Shi, R. Rojas, J. S. Bonifacino, and J. H. Hurley, "The retromer subunit Vps26 has an arrestin fold and binds Vps35 through its C-terminal domain," *Nature Structural and Molecular Biology*, vol. 13, no. 6, pp. 540–548, 2006.
- [82] B. M. Collins, S. J. Norwood, M. C. Kerr et al., "Structure of Vps26B and mapping of its interaction with the retromer protein complex," *Traffic*, vol. 9, no. 3, pp. 366–379, 2008.
- [83] N. A. Boase and J. M. Kelly, "A role for creD, a carbon catabolite repression gene from *Aspergillus nidulans*, in ubiquitination," *Molecular Microbiology*, vol. 53, no. 3, pp. 929–940, 2004.
- [84] E. Nikko and H. R. B. Pelham, "Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma membrane transporters," *Traffic*, vol. 10, no. 12, pp. 1856–1867, 2009.
- [85] E. Nikko, J. A. Sullivan, and H. R. B. Pelham, "Arrestin-like proteins mediate ubiquitination and endocytosis of the yeast metal transporter Smf1," *EMBO Reports*, vol. 9, no. 12, pp. 1216–1221, 2008.
- [86] T. Andoh, Y. Hirata, and A. Kikuchi, "PY motifs of Rod1 are required for binding to Rsp5 and for drug resistance," *FEBS Letters*, vol. 525, no. 1–3, pp. 131–134, 2002.
- [87] Y. Kee, W. Muñoz, N. Lyon, and J. M. Huibregtse, "The deubiquitinating enzyme Ubp2 modulates Rsp5-dependent Lys⁶³-linked polyubiquitin conjugates in *Saccharomyces cerevisiae*," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 48, pp. 36724–36731, 2006.
- [88] R. Gupta, B. Kus, C. Fladd et al., "Ubiquitination screen using protein microarrays for comprehensive identification of Rsp5 substrates in yeast," *Molecular Systems Biology*, vol. 3, article 116, 2007.
- [89] A. Herrador, S. Herranz, D. Lara, and O. Vincent, "Recruitment of the ESCRT machinery to a putative seven-transmembrane-domain receptor is mediated by an arrestin-related protein," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 30, no. 4, pp. 897–907, 2010.
- [90] R. Hatakeyama, M. Kamiya, T. Takahara, and T. Maeda, "Endocytosis of the aspartic acid/glutamic acid transporter Dip5 is triggered by substrate-dependent recruitment of the Rsp5 ubiquitin ligase via the arrestin-like protein Aly2," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 30, no. 24, pp. 5598–5607, 2010.
- [91] N. Belgareh-Touzé, S. Léon, Z. Erpapazoglou, M. Stawiecka-Mirotta, D. Urban-Grimal, and R. Haguenauer-Tsapis, "Versatile role of the yeast ubiquitin ligase Rsp5p in intracellular trafficking," *Biochemical Society Transactions*, vol. 36, part 5, pp. 791–796, 2008.
- [92] J. A. MacGurn, P.-C. Hsu, M. B. Smolka, and S. D. Emr, "TORC1 regulates endocytosis via npr1-mediated phospho-inhibition of a ubiquitin ligase adaptor," *Cell*, vol. 147, no. 5, pp. 1104–1117, 2011.
- [93] A. F. O'Donnell, A. Apffel, R. G. Gardner, and M. S. Cyert, "α-arrestins Aly1 and Aly2 regulate intracellular trafficking in response to nutrient signaling," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 21, no. 20, pp. 3552–3566, 2010.
- [94] J. F. Nabhan, R. Hu, R. S. Oh, S. N. Cohen, and Q. Lu, "Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein," *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, no. 11, pp. 4146–4151, 2012.
- [95] J. F. Nabhan, H. Pan, and Q. Lu, “Arrestin domain-containing protein 3 recruits the NEDD4 E3 ligase to mediate ubiquitination of the β_2 -adrenergic receptor,” *EMBO Reports*, vol. 11, no. 8, pp. 605–611, 2010.
- [96] S. Rauch and J. Martin-Serrano, “Multiple interactions between the ESCRT machinery and arrestin-related proteins: implications for PPXY-dependent budding,” *Journal of Virology*, vol. 85, no. 7, pp. 3546–3556, 2011.
- [97] P. Zhang, C. Wang, K. Gao et al., “The ubiquitin ligase itch regulates apoptosis by targeting thioredoxin-interacting protein for ubiquitin-dependent degradation,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 12, pp. 8869–8879, 2010.
- [98] H. Storez, M. G. H. Scott, H. Issafras et al., “Homo- and hetero-oligomerization of β -arrestins in living cells,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 48, pp. 40210–40215, 2005.
- [99] K. M. Draheim, H. B. Chen, Q. Tao, N. Moore, M. Roche, and S. Lyle, “ARRDC3 suppresses breast cancer progression by negatively regulating integrin β_4 ,” *Oncogene*, vol. 29, no. 36, pp. 5032–5047, 2010.
- [100] M. A. Peñalva, J. Tilburn, E. Bignell, and H. N. Arst Jr., “Ambient pH gene regulation in fungi: making connections,” *Trends in Microbiology*, vol. 16, no. 6, pp. 291–300, 2008.
- [101] M. Hayashi, T. Fukuzawa, H. Sorimachi, and T. Maeda, “Constitutive activation of the pH-responsive Rim101 pathway in yeast mutants defective in late steps of the MVB/ESCRT pathway,” *Molecular and Cellular Biology*, vol. 25, no. 21, pp. 9478–9490, 2005.
- [102] W. Xu, F. J. Smith Jr., R. Subaran, and A. P. Mitchell, “Multivesicular body-ESCRT components function in pH response regulation in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*,” *Molecular Biology of the Cell*, vol. 15, no. 12, pp. 5528–5537, 2004.
- [103] J. H. Boysen and A. P. Mitchell, “Control of Bro1-domain protein Rim20 localization by external pH, ESCRT machinery, and the *Saccharomyces cerevisiae* Rim101 pathway,” *Molecular Biology of the Cell*, vol. 17, no. 3, pp. 1344–1353, 2006.
- [104] A. Galindo, A. M. Calcagno-Pizarelli, H. N. Arst Jr., and M. Á. Peñalva, “An ordered pathway for the assembly of fungal ESCRT-containing ambient pH signalling complexes at the plasma membrane,” *Journal of Cell Science*, vol. 125, no. 7, pp. 1784–1795, 2012.
- [105] L. Kuo and E. O. Freed, “ARRDC1 as a mediator of microvesicle budding,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, no. 11, pp. 4025–4026, 2012.
- [106] E. Morita, “Differential requirements of mammalian ESCRTs in multivesicular body formation, virus budding and cell division,” *The FEBS Journal*, vol. 279, no. 8, pp. 1399–1406, 2012.
- [107] S. K. Shenoy, L. S. Barak, K. Xiao et al., “Ubiquitination of β -arrestin links seven-transmembrane receptor endocytosis and ERK activation,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 40, pp. 29549–29562, 2007.
- [108] R. H. Oakley, S. A. Laporte, J. A. Holt, M. G. Caron, and L. S. Barak, “Differential affinities of visual arrestin, β arrestin1, and β arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 22, pp. 17201–17210, 2000.
- [109] E. V. Gurevich and V. V. Gurevich, “Arrestins: ubiquitous regulators of cellular signaling pathways,” *Genome Biology*, vol. 7, no. 9, article 236, 2006.
- [110] A. Hervás-Aguilar, A. Galindo, and M. A. Peñalva, “Receptor-independent ambient pH signaling by ubiquitin attachment to fungal arrestin-like PalF,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 23, pp. 18095–18102, 2010.
- [111] T. Hunter, “The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond,” *Molecular Cell*, vol. 28, no. 5, pp. 730–738, 2007.
- [112] F. T. Lin, K. M. Krueger, H. E. Kendall et al., “Clathrin-mediated endocytosis of the β -adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of β -arrestin1,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 49, pp. 31051–31057, 1997.
- [113] F. T. Lin, W. Chen, S. Shenoy, M. Cong, S. T. Exum, and R. J. Lefkowitz, “Phosphorylation of β -arrestin2 regulates its function in internalization of β_2 -adrenergic receptors,” *Biochemistry*, vol. 41, no. 34, pp. 10692–10699, 2002.
- [114] A. Kiselev, M. Socolich, J. Vinos, R. W. Hardy, C. S. Zuker, and R. Ranganathan, “A molecular pathway for light-dependent photoreceptor apoptosis in *Drosophila*,” *Neuron*, vol. 28, no. 1, pp. 139–152, 2000.
- [115] F. T. Lin, W. E. Miller, L. M. Luttrell, and R. J. Lefkowitz, “Feedback regulation of β -arrestin1 function by extracellular signal-regulated kinases,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 23, pp. 15971–15974, 1999.
- [116] J. Gomez-Raja and D. A. Davis, “The β -arrestin-like protein Rim8 is hyperphosphorylated and complexes with Rim21 and Rim101 to promote adaptation to neutral-alkaline pH,” *Eukaryotic Cell*, vol. 11, no. 5, pp. 683–693, 2012.